

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公表

⑪ 公表特許公報 (A)

平3-501624

⑫ Int. Cl.⁶
A 61 K 35/78
39/39

識別記号
ABD V
ACL

庁内整理番号
8412-4C
8829-4C

審査請求未請求
予備審査請求未請求
部門(区分) 3 (2)

(全 47 頁)

⑬ 明の名称 アロエ組成物およびその使用

⑭ 特 願 平1-509805
⑮ 出 願 平1(1989) 8月3日

⑯ 翻訳文提出日 平2(1990) 4月5日

⑰ 国際出願 PCT/US89/03381

⑱ 國際公開番号 WO90/01253

⑲ 國際公開日 平2(1990) 2月22日

優先権主張 ⑩ 1988年 8月 5日 ⑩ 米国(US) ⑩ 229,164
 ⑪ 発明者 マツカナレイ ビル エツチ、 アメリカ合衆国、 テキサス 75052, グランドブレーリー チョーグ コート 4602
 ⑫ 出願人 カーリントン ラボラトリーズ アメリカ合衆国、 テキサス 75062, アービング、 イースト ロッキンコーポレーションズ 1300
 ⑬ 代理人 弁理士 松井 光夫
 ⑭ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

添付(内容に変更なし)

請求の範囲

- 単核細胞及びマクロファージ末梢血付着細胞によりホルマント動物におけるインターロイキン1及びプロスタグランジンE₂の生産を活性化、 脱毛及び高める方法において、 单核細胞及びマクロファージ刺激を行うに十分な量のアセマンナンをホルマント動物に投与することを含む方法。
- アセマンナンが約 0.1mg/kg bwt/日～約 100.0mg/kg bwt/日の範囲で経口投与される、 又は約 0.001mg/kg bwt/日～10mg/kg bwt/日の範囲で注射投与される請求項1記載の方法。
- 哺乳動物においてマクロファージ食細胞溶解を刺激する方法において、 单核細胞及びマクロファージ刺激を行うに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。
- 哺乳動物において抗ウイルス作用を作る方法において、 单核細胞及びマクロファージ刺激を行うに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。
- ヒトにおいて欠陥ウイルスを作る方法において、 单核細胞及びマクロファージ刺激を行いかつウイルス感染細胞におけるウイルスの複製代謝を止めるに十分な量のアセマンナンをヒトに投与することを含む方法。
- ワクチン生産のためのマスター細胞培養物において欠陥ウイルスを作る方法において、 変化されたウイルス複製を作ることに十分な所定量のアセマンナンをマスター細胞培養物

に加えることを含む方法。

7. アジュバント効果を作ることによるワクチンの免疫增强方法において、 ワクチン投与量当たり約 0.001mg～10mgの範囲の所定量のアセマンナンをワクチン製品に加えることを含む方法。

8. 哺乳動物における腫瘍を処置する方法において、 单核細胞及びマクロファージ刺激を行い、 自然の殺細胞活動を高め、 かつ白細胞及び/又は抗体による特異的腫瘍細胞溶解を高めるに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。

9. (I) 非感染細胞の小胞体およびゴルジ体中にアセマンナンを誘導して、 ウィルス感染からの保護を該細胞に与えるところの與えられたグリコプロテインを起す、 または (II) ウィルス感染細胞の小胞体およびゴルジ体中にアセマンナンを誘導して、 該感染細胞中でのウイルス表現を破壊又は禁止するところのグリコプロテインを作る方法において、 細胞の表面のグリコプロテインを変性するに十分な量のアセマンナンを細胞中に誘導することを含む方法。

10. 細胞がウイルス感染され、 かつアセマンナンがウイルスを非感染とするに十分な量で細胞中に誘導される請求項9記載の方法。

11. 細胞がウイルス感染され、 (I)アセマンナン誘導前に細胞が持っていたよりも広い感染細胞に対する免疫応答を与える広域スペクトルの特異的抗原が産生されかつ、 感染細胞表面に表現されるようにする、 又は (II)ヒト又は動物

特表平3-501624(2)

により広域スペクトル抗体産生の速度を高めるのに十分な量でアセマンナンが細胞中に導入される請求項9記載の方法。

12. 哺乳動物において、増加された量のマンノースを細胞内及び細胞外細胞代謝経路に与えて、ヒトまたは動物における吸収不良及び粘膜細胞成熟症候群を矯正する方法において、マンノシルトランスフェラーゼ活性のミバエリス定数を加速することによってグリコプロテインの合成のための追加的マンノースを与えるのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。

13. 哺乳動物においてウイルス感染細胞を、細胞表面リンパ細胞により抗体依存性細胞溶解を開始するであろうその表面上で変性ウイルスグリコプロテイン抗原を表現するよう誘導する方法において、変性されたウイルスグリコプロテインを作りかつ上記変性されたウイルスグリコプロテインが、それらを体液性抗体に吸すき感染細胞の表面上で表現されるようにするために十分な量のアセマンナンを哺乳動物に感染細胞中へ投与することを含む方法。

14. ヒトの中にアセマンナンを誘導して、多発性硬化症に関する症候群を低減する効果を作る方法において、ブラーク形成を低減し、かつ中枢神経系細胞において官能性組織でのブラーク形成を誘発するのに十分な量のアセマンナンをヒトに投与することを含む方法。

15. 哺乳動物中にアセマンナンを誘導して、炎症性脳疾患に関する症候群を低減する方法において、病巣中の潰瘍

の組織再生を増大することにより及び病巣中の局部的組織中の自己免疫グロブリンの低減により、炎症性脳疾患に関する病巣を解消するのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。

添付(内容に変更なし)

日月 系田 香子

アロエ組成物およびその使用

関連出願

本出願は、1988年1月14日に出版された米国出版シリアル番号144,872号の一部権統であり、それは「アロエ製品の製造方法」という名称であり、その全内容および開示がここで参考として具体的に組み込まれる。前記米国出版シリアル番号144,872号は、米国出版シリアル番号609,261号、名称「アロエ製品の製造方法、それによって製造された製品およびその組成物」、米国特許第4,735,935号として1988年4月5日に特許付与されたもの一部権統出版であり、その全内容および開示もまたここに参考として具体的に組み込まれる。前記米国出版シリアル番号609,201号は、1988年6月20日に出版され、1987年1月16日に国際公開番号WO87/00052のもとに公開された国際出版番号PCT/US86/01335号に対応しており、その全内容および開示もまたここに参考として具体的に組み込まれる。1988年1月14日に出版された、シリアル番号609,261号は、1985年12月17日に出版された米国出版シリアル番号810,025号(現在、放棄された)の一部権統であり、これは1985年7月12日に出版された米国出版シリアル番号754,859号(現在、放棄された)の一部権統であり、これ

は1986年6月28日に出版された米国出版シリアル番号750,821号(現在、放棄された)の一部権統であり、これは1984年9月12日に出版された米国出版シリアル番号649,967号(現在、放棄された)の一部権統であり、これは1982年5月7日に出版された米国出版シリアル番号375,720号(現在、放棄された)の一部権統である。出版シリアル番号810,025号は「アロエ製品の製造方法およびそれによって製造される製品」という名称である。出版シリアル番号754,859号；750,821号；649,967号；および375,720号は「アロエベラ製品の製造方法」という名称である。

発明の背景

1. 発明の分野

この発明はアロエ植物を処理し、この植物の一部を取り出して局所用ならびに内服用の組成物に処理する技術ならびにこのアロエの部分を含む組成物およびその使用に関する。

2. 従来技術の説明およびその他の情報

アロエベラは広く信じられていたようなサボテン植物ではなく、むしろユリ科の仲間である。約380種のアロエ植物が知られている。ハーディング、アロエズオブザワールド(Aloes of the World)：アチェックリストインデックス アンド コード(A Checklist, Index and Code), エクセルサ9(Excelsa 9) : 57-04(1979)がある。それらは暑い乾燥した地方に生育するようであり、

特表平3-501624(3)

地中海、中東、アフリカ、中国、日本、メキシコおよびアメリカ合衆国南部から広く分布している。その医薬特性のために用いられるいくらかの重要な種に、アロエ バルバデンシス ミラー (*Aloe barbadensis Miller*) (アロエ ベラ)、*A. arborescens*、*A. plicatilis*、*A. bahamensis*、*A. saponaria*、*A. africana*、*A. ferox* およびアロエ ペリイ (*Aloe parryi*) がある。レイノルズ (Reynolds)、アロエズ オブ トロピカル アフリカ アンド マダガスカル (*Aloes of Tropical Africa and Madagascar*)、ザ ト拉斯ティーズ (The Trustees)、アロエ記録基金 (The Aloe Book Fund)、ババネ スワジランド (Babane Swaziland)。しかし、*A. barbadensis Miller* は、広く用いられ、いわれるところの最も効果的な治療力のため、「萬のアロエ」として一般的に認められているが、日本では *A. arborescens* が骨髄疾患から水虫までの範囲にわたる種々の病気のための民間治療法として、伝統的に用いられてきた。

アロエ ベラは、ロゼット模様で茎に結合しているふくらんだ緑の葉を持つ多年生植物である。成熟した植物の葉は緑に沿ってのこぎり歯の鋭い先を持ち、長さ25インチより大きくなりうる。

第1図および第2図に示したように葉を横断的に切ると、

ブルース (Bruce)、エクセルサ (*Excelsa*) 57-88 (1975)；スガ (Suga) ら、コズメティック アンド ト イレクリーズ (*Cosmetic and Toiletries*) 105-108 (1983)。

その植物の葉組織細胞からの粘液質のジェリーをアロエ ベラ ゲルという。ゲルが不適当な処理技術によって汚染されなければ、分解したり、ゲルの変色の原因となるアントラキノンは通常存在しない。

アロエ ベラ ゲルは、約88.5%の水である。全固形分の80%より多くが炭水化物起源のポリサッカライドからできている。有機酸および無機化合物、特にシウ酸カルシウムが固体分の残余を成す。

アロエ植物の葉全部、抽出液および新鮮なゲルが、人間の種々の苦痛のために用いられてきた。医薬の治療薬としてそれを使用した证据は、紀元前400年のエジプト人にさかのぼることができる。アロエ ベラはまた死体に防腐保険処理を施し、かつ死を引き起こすものから死体の防腐保険処理者を保護するために用いられた。他の初期の文明はアロエ ベラを、皮膚の手入れ、虫に刺されたりくわれたりした傷の手当て、かき傷および潰瘍の処置、傷の治療の促進、髪が失なわれるのを防いだり下剤として用いられた。それは驅虫剤として、下剤として、健胃剤として、多くの文化の伝統的な薬であり、そしてとりわけ痘病、火傷およびアレルギー性の病気のために用いられた。コール (cole) ら、アーキップス オブ ダーマトロジー アンド シフィロ

厚いクチクラで覆われた表皮 (3) の外壁が見える。表皮 (3) の下に、柔軟繊維として知られている葉緑組織細胞とより薄い壁で仕切られた細胞とに区別される葉肉がある。葉緑組織細胞は透明な粘液質のジェリー (1) を収容する。内に細管束細胞を有する葉管束 (2) は緩下剤特性を有する黄色の液汁を含み、また2つの主な細胞には含まれている。植物細胞で代謝副産物として生成されるシウ酸カルシウムの針状結晶が、葉の中央部分で主に見つかる。

アロエ ベラは2つの主な根源、すなわち黄色のラテックス (渗出液) と透明ゲル (粘液) を含んでいる。アロエ バルバデンシス ミラーの葉の乾燥させた渗出液をアロエ という。商業的名称はクラカオ アロエ (Curacao aloe) である。それは主としてアロイン、アロエ・エモジンおよびフェノールからなる。ブルース (Bruce)、サウス アフリカン メディカル ジャーナル (*South African Medical Journal*) 41: 984 (1987) ; モロー (Horroy) ら、アーキップス ダーマトロジー (*Archives Dermatology*) 118: 1084-1085 (1980) ; サレク (Salek) ら、コロージョン プリベンション & コントロール (*Corrosion Prevention & Control*) 9-10 (1989) ; マップ (Mapp) ら、プランタ メディカ (*Planta Medica*) 18: 301-305 (1970) ; ランワルド (Ranwald)、アーキップス ファーマジー (*Archives Pharmacy*) 316: 477-478 (1982)。アントラキノン類およびそのグリコシド類を含む多くのフェノール類が、薬理的に活性であることが知られている。

ロジー (*Archives of Dermatology and Syphilology*) 47: 250 (1943) ; コプラ (Chopra) ら、グロサリー オブ インディアン メディシナル プランツ (*Glossary of Indian Medicinal Plants*)、カウンシル オブ サイエンティフィック アンド インダストリアルリサーチ (Council of Scientific and Industrial Research)、ニュー デリー (New Delhi); シップ (Ship)、ジャーナル オブ ザ アメリカン メディカル アソシエーション (*Journal of the American Medical Association*) 238: 1770-1772 (1977); モートン (Horton)、アトラス オブ メディカル プランツ オブ ミドル アメリカン バハマズ トウ ユカタン (*Atlas of Medical Plants of Middle American Bahamas to Yucatan*)、チャールズ C. トマス パブリッシャー (Charles C. Thomas Publisher), 78-80 (1981); ディーズ・マーチンズ (Díez-Hartinez)、ラ ザビラ (La Zabila)、コミニカド No. 46 ソブレレクルソス ピオティコス ポテンシャレス デル バイス (*Comunicado No. 46 Sobre Recursos Bióticos Potenciales del País*)、I N I R E B、メキシコ (Mexico) (1981); ダスツール (Dastur)、メディシナル プランツ オブ インディア アンド パキスタン (*Medicinal Plants of India and Pakistan*) ; D. B. タラボレバラ サンズ (Talaborevala Sons) & Co., プライベート (Private) Ltd., ボンベイ (Bombay) 16-17 (1962)。

特表平3-501624(4)

アロエ ベラは、「医療」または「治療性」を持つとして業人の支持 (by acceptance) の長い歴史を享受してきた。最近数年にわたって、科学的基準を満たした多くの本や論文が、アロエ ベラについて書かれてきた。アロエ ベラ会議 (Aloe Vera Council) のような組織および公認された医学会が医者、歯医および他の科学者の対話や事例史を通して「アロエ現象」を信じてきた。アロエ ベラは皮膚科学、特に放射線に原因する皮膚病の治療の分野において広く重要な役割を演じてきた。マッキー (Hackee), X-レイ アンド ラジウム イン ザ トリートメント オブ ティジージズ オブ ザ スキン (X-Rays and Radiotherapy in the Treatment of Diseases of the Skin), 第3版, リー アンド フェビガー (Lee and Febiger), フィラデルフィア (Philadelphia), 319-320(1938); ロバーリ (Robart) ら, インダストリアル メディシン アンド サージェリー (Industrial Medicine and Surgery), 28: 364-368(1950); ザワリー (Zavahry) ら, クオテーションズ フロム メディカル ジャーナルズ オン アロエ リサーチ (Quotations From Medical Journals on Aloe Research), 編集マックス (Max) B. スコーセン (Skousen), アロエ ベラ リサーチ インスティチュート (Aloe Vera Research Institute), シプレス (Cypress), カリフォルニア (California), 18-28(1977); セラ (Cora) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン アニマル ホスピタル アソシエーション (Journal

of the American Animal Hospital Association), 18: 633-688(1982)。殺ウイルス剤、殺菌剤および防カビ剤として消化系統の問題における、また婦人科学的病気における医学的適用について記載した一連の科学文献は広範囲であり、グリンドレー (Grindley) とレイノルズ (Reynolds) により、十分に概説された [ジャーナル オブ エトノファーマコロジー (Journal of Ethnopharmacology), 16: 117-151 (1980)]。

アロエにおいて見出された化学品の重要性はまだ、それらが誰にも知られている固定調査方に載せられてきたという事實により示される。U. S. ファーマコペイア (U. S. Pharmacopoeia), 第20改訂版, ザ ナショナル フォーミュラリー (The National Formulary), 第14版, ユナイテッド ステイツ ファーマコペイアル コンベンション (United States Pharmacopoeial Convention), Inc., ロックビル (Rockville), メリーランド, 1980年7月1日。しかし、U. S. ファーマコペイアはアロエの黄色の液汁の薬効部について述べているが、粘液については述べていない。新鮮な保存されていないゲルは約98.5~99.2%が水である。水を除去した後に残っている固形分は0.8から1.6%の範囲にある。固形分の主な構成成分は、粘液、糖、樹脂、タンパク質、灰分、脂肪、アロインおよび樹脂を含む。ロブソン (Robson) ら, ジャーナル オブ バーン ケア リハビリテーション (Journal of Burn Care Rehabilitation), 3: 157-163(1982)。詳察、

有機酸、無機塩、アミノ酸およびアルカリイドを含む組成物の報告がなされている。ロウ (Roso) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ファーマシーティカル アソシエーション (Journal of the American Pharmaceutical Association), 30: 202-208(1941); ロボツ (Roboz) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society), 70: 3248-3249(1948); ウォーラー (Waller) ら, プロシードィングズ オブ オクラホマ アカデミー オブ サイエンス (Proceedings of Oklahoma Academy of Science), 58: 69-78(1978)。糞を処理する方法に依存して、粘液と糖が脱水したゲルの主成分である。みつかった糖は、ガラクトース、グルコース、マンノース、ラムノース、キシロースおよびウロン酸である。相反する報告が見られるが、粘液は主にマンナンとグルコマンナンからなる。エベレンデュ (Eberendu) ら, ザ ケミカル キャラクタリゼーション オブ キャリシン (The Chemical Characterization of Carrizyn (登録商標)) (調製); マンダル (Mandal) ら, カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research), 87: 249-250(1980b); ロボツ (Roboz) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society), 70: 3248-3249(1948); ゴーダ (Govda) ら, カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research), 72: 201-205(1978); セガル (Segal) ら, ロイディア

(Lloydia), 31: 428(1968)。

この仕事に先立つて、アロエ ベラにおける活性物質の同一性に関する論争は静まっている。それ故に、ゲルに依存する成分と溶出液に見出された成分を明確に区別することが重要である。ゲルの比較的多い部分は、少量の種々の他の化合物を含む主としてポリサッカライド質の粘液である。観察される活性のいくつかにおいて、ポリサッカライド主成分と他の成分との間の何らかの相乗作用 (synergistic action) がありうることが観察された。ロイシング (Leung), エクセルサ (Excelsa) 8: 65-68(1978); ヘンリー (Henry), コズメティック アンド トライアリーズ (Cosmetic and Toiletries), 94: 42-50(1979)。例えば、傷の治療に効果的な成分は、タンニン酸 (tannic acid) [フレイタグ (Freytag), ファーマツィー (Pharmazie), 9: 705 (1954)] およびポリサッカライドの一例でありうることが数人の研究者によって報告されている。カワシマ (Kawashima) ら, ケミカル アブストラクツ (Chemical Abstracts), 83: 19075(1979)。上記のマッキー (Hackee) は、ゲル (外皮や溶出液ではなく) は、放射線火傷の治療に有益な効果の原因となることを記し、そして彼は効果的な治療のために新鮮な葉を用いることの重要性を強調した。ポリサッカライドは、時間とともに分解する。そしてある分子量サイズが特定の物理的応答を引き出すのに必要とされる。ゴトウ (Goto) ら, ガン (Gann), 83: 371-374(1972)。

特表平3-501624(5)

他の成分からの助効なしに、ポリサッカライドは薬理学的および生理学的活性を示すことができるという多くの例が文献にある。G. ギアルドロニ-グラッシ (Giardroni-Grassi) ら、インターナショナル アーキブス オブ アレルギー アンド アプライド イムノロジー (International Archives of Allergy and Applied Immunology) , 76 (suppl. 1) ; 119-127 (1985) ; オオノ (Ohno) ら、ケミカル アンド ファーマシューティカル ブレティン (Chemical and Pharmaceutical Bulletin) , 33 : 2564-2568 (1985) ; リー ホビシ (Leibovici) ら、ケミコ・バイオロジカル インターラクションズ (Chemico-Biological Interactions) , 60 : 101-200 (1986) ; ウカイ (Ukai) ら、ケミカル アンド ファーマシューティカル ブレティン (Chemical and Pharmaceutical Bulletin) , 81 : 741-744 (1983) ; リー ホビシ (Leibovici) ら、アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research) , 5 : 669-668 (1985)。1つのそのような例は、アテローム性動脈硬化症 (atherosclerosis) の発生に関する。一般糖尿病における、特に血統的なコレステロール過多血症 (hypercholesterolemia) における脂肪過多血症 (hyperlipidemia) は冠状動脈の心臓病および死と関連づけられる。食物繊維の摂取量が高い程では、アテローム性動脈硬化症の発現は一般的ではない。トロウェル (Trovell) ら報告、リファインド カーボハイドレート フード アンド ディジーズ (Refined Carbohydrate Foods and

セ - (Annals Iscounologieae Hungaricae) , 21 : 286-290 (1981)。マッシュルーム、イースト又はバクテリア抽出物由来のポリサッカライドがウイルスや腫瘍の侵入に対しての高程度の宿主防御活性を引き出すことができるという、いくつかの報告がある。チハラ (Chihara) ら、ネイチャー (Nature) , 222 : 887 (1900) ; シュワルツマン (Schwartzman)、プローシーディングス オブ ザ ソサイエティ フォー イクスペリメンタル バイオロジー アンド メディシン (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine) , 29 : 737 (1932) ; レディ (Rethy)、エックス インターナショナル コングレス オブ ミクロバイオロジー; モスクワ (X. International Congress of Microbiology: Moscow) , 642 (1980)。スズキ (Suzuki) らはまた、図類、グリフォラフロンドサ (Grifola frondosa) の培養した子実体 (fruiting bodies) から抽出したポリサッカライド画分 (GF-1) の抗腫瘍活性について報告した [ジャーナル オブ ファーマコバイオ-ダイナミックス (Journal of Pharmacobi-Dynamics) , 7 : 482-500 (1984)]。この画分は、皮膚内 (I.P.) 、筋膜内 (I.V.) および腫瘍内 (I.T.) 投与した時に、より高い阻害活性の等価レベルを示した。しかし、経口投与 (P.O.) は効果的でなかった。GF-1 画分はまた、マウスでメタ (Met) A 横結肉腫およびMM46癌の固体形に対して、抗腫瘍活性を示した。レンチナン (Lentinan) は GF-1 に似た 6- 分枝 B-1-3-

Bisance)、ロンドン (London)、アカデミック プレス (Academic Press), 207 (1975)。ベクチンおよびグアーハーは、正常者および脂肪過多血症患者においてコレステロールを低くすることが報告されている。ケイ (Key) ら、アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition) , 30 : 171-175 (1977)。ハリエンジュの豆 (Locust bean) のガムは、マンノースとガラクトースからなるポリサッカライドであり、これは正常者および血統的コレステロール過多血症の人の両方の場合にプラズマリボタンパクコレステロール濃度を減少させた。ザボラル (Zavoral) ら、アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition) , 38 : 286-294 (1983)。炭水化物食にグアーガムを添加すると、正常者および糖尿病の人の両方において、食後のグルコースの上昇を抑えた。ジェンキンズ (Jenkins) ら、ランセット (Lancet) , 2 : 779-780 (1977)。クール (Kuhl) らは、グアーガムが妊娠しているインシュリン依存糖尿病患者の血糖制御を示すことを証明した (ダイアビット ケア (Diabetes Care) , 8 : (2) : 152-154 (1985))。

ポリサッカライドの抗腫瘍活性は広く報告されてきた。レンティヌス シアチフォルミス (Lentinus edodes) から調製したポリサッカライドは、腫瘍に対して宿主防御を増加させることが知られている。レディ (Rethy) ら、アナールス イムノロジー ハンガリ

結合グルカンであり、これはメタ A 横結肉腫に対して効果がない。チホラ (Chihara)、抗腫瘍ポリサッカライドレンチナン：報告、「宿主防御機構の操作 (Manipulation of Host Defense Mechanism)」；アオキ (Aoki) ら報告、エクセプタ メディカ (Excerpta Medica) , 北オランダ, 1-16 (1981)；ササキ (Sasaki) ら、カーボハイドレートリサーチ (Carbohydrate Research) , 47 : 99-104 (1976)。合成した分枝ポリサッカライドは腫瘍に対して生物活性を示すことが報告された。マツザキ (Hatsuzaki) ら、マクロモル ケム (Hakronol. Chem.) , 106 : 449 (1985)。マツザキ (Hatsuzaki) らは、苦しい活性を示す、アイボリーナット (Ivory nut) マンナン由来の分枝ポリサッカライドである。B-(1-4)-D-マンノピラノースおよびB-(1-4)-結合グルコマンナンを合成した (マクロモル ケム (Hakronol. Chem.) , 107 : 325-331 (1986))。ディクチオフォリア インドウシアタフィッシュ (Dictyophoridium Industria Fisch) の子実体から抽出した、部分的にアセチル化された線状 B-(1-3)-D-マンナンはまた抗腫瘍活性を示した。ハラ (Hara) ら、カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) , 143 : 111 (1982)。B-(1-3)-グルカンタイプのポリマーは、B-(1-4)-グルカンおよびヘミセルロース性ポリマーよりも高い抗腫瘍活性を示すので、抗腫瘍活性はポリマー主鎖のタイプおよびその重合の程度に依存するようである。マツザキ (Hatsuzaki) ら、マ

クロモル ケム (Hakrosol, Chem.) , 187: 825 - 331 (1986)。細胞の培養液過濾から得たB- (1・3)・グルカンのカルボキシメチル化誘導体は、確立されたサルコーマ 180腫瘍から、誘導体の注入後2時間以内に重大な細胞損失を引き起こした。ババ (Baba) ら、ジニー オブ イムノファーマコロジー (J. of Immunopharmacology) , 8: 560 - 572 (1980)。同じ著者は、その物質の注入による、多形核白血球での代償的な増加を観察した。ところで、ベスタチン (bestatin) は、免疫調節および抗腫瘍活性を持つことが知られているジペプチドであり (イシズカ (Ishizuka) ら、ジャーナル オブ アンチバイオティックス (Journal of Antibiotics) , 32: 642 - 652 (1980))、これは腫瘍発生にも多形核白血球の殺滅にも影響を及ぼさなかった。ババ (Baba) ら、上記。

ヘパリン (heparin) (ジョレス (Jolles) ら、アクタ ユニブ イント キャンサー (Acta Univ. Int. Cancer) , 10: 882 - 885 (1980) ; スエマス (Suemasu) ら、ガン (Gann) , 81: 126 - 130 (1970))、硫酸塩化したラミナラン (laminaran) およびデキストランを含む硫酸塩化したポリサッカライドの抗腫瘍効果について多くの報告がある。ジョレス (Jolles) ら、ブリティッシュ ジャーナル オブ キャンサー (British Journal of Cancer) , 17: 109 - 115 (1963)。ヤマモト (Yamamoto) らは、さらに硫酸塩化することにより、フコイダン (fucoidan) 四分の抗腫瘍活性を高めることを報告した [ジャパン ジャーナル オ

ブ エクスペリメンタル メディシン (Japan Journal of Experimental Medicine) , 64: 148 - 151 (1984)]。硫酸塩化した生成物はL-1210白血病に対する活性を示した。著者らは、抗腫瘍活性の機構は部分的に、腫瘍細胞と中皮細胞 (mesothelial cell)との間の節制作用から生じるL-1210細胞の侵入成長の阻害によるものであると仮定した。ヤマモト (Yamamoto) ら、上記。硫酸塩基を持つポリサッカライドはまた、ヒトのT細胞マイタゲン (mitogen) およびネズミ科のポリクローナルB細胞活性化剤であることが報告されている。スガワラ (Sugawara) ら、ミクロバイオロジカル イムノロジー (Microbiological Immunology) , 28: 831 - 839 (1984)。一般に、硫酸塩基を有する高分子量のホモポリサッカライドはこれらの特性を持っている。ドリーズ (Dorries) ら、ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology) , 4: 230 - 233 (1974) ; スガワラ (Sugawara) ら、セル イムノロジー (Cell Immunology) , 74: 182 - 171 (1982)。

イーストのサッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から抽出したグルカンは細胞性および体液性免疫を調節するものであることが報告された。ウーレス (Wooles) ら、サイエンス (Science) , 142: 1078 - 1080 (1963)。ポリサッカライドはまた、ネズミ科の多能性造血幹細胞、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞および骨髓性および赤血球コロニー形成細胞

の増殖を刺激した。ポスピシル (Pospisil) ら、エクスペリエンティア (Experientia) , 38: 1282 - 1284 (1982) ; ブルガレタ (Bulgareta) ら、キャンサー リサーチ (Cancer Research) , 37: 1789 - 1742 (1977)。マイシン (Malsin) らはまた、X線にさらされることに対するネズミ科の造血幹細胞の保護を引き起こし、それによってそのようにさらされたマウスの死亡率を減少させる、ポリサッカライドのIV投与を報告した [ラジエーション リサーチ (Radiation Research) , 105: 278 - 281 (1986)]。

V. ラコビック (Lackovic) ら [Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine] , 184: 874-879 (1970)] は、イースト細胞壁を取り、单核細胞によるインターフェロンの製造の誘導の原因である、彼が見出した「マンナン類」のみを残して、すべての成分物質を抽出した。生物学的応答の原因であるといわれる「精製したマンナン」は 5,600~20,000 ドルトンの分子量を有していた。彼は、このマンナンがマウス腹膜のマクロファージを刺激してインターフェロンを製造することを理論づけた。彼は、彼が単離したマンナンが毒性を示す、かつ「これらが、弱い抗原である」ことを主張している。ラコビックらによれば、これらの「精製したマンナン類」の抗ウイルス活性または T-1 刺激に対する使用についての記載はなかった。我々は、一連の非公知のそして同定

されていない置換および非置換マンナン類を含む、ラコビックらの「精製したマンナン類」を提示した。

セルジェリッド (Seljelid) らは、不溶性またはゲル形成性グリカンがインビトロ (*In vitro*) でマクロファージを活性化し、一方対応する可溶性のグリカンは活性化しないことを観察した [エクスペリメンタル セル リサーチ (Experimental Cell Research) , 131: 121 (1981)]。彼らは、グリカンが単核食細胞に提示される方向づけが活性化のために決定的であると仮定した。ボグワルド (Bogwald) らは、インビトロでマクロファージに刺激的効果を持つグリカンを固定した [スカンジナビアン ジャーナル オブ イムノロジー (Scandinavian Journal of Immunology) , 20: 355-360 (1984)]。これにより著者らは、グリカンの固定した配置がインビトロでのマクロファージへの効果に決定的であると信ずることとなった。カンジダ アルビカンス (*Candida albicans*) から単離した精製ポリサッカライドは人間の末梢血液リンパ球によりインビトロでの抗体応答を引き起こした。ウィルツ (Hirz) ら、クリニカル イムノロジー アンド イムノパソロジー (Clinical Immunology and Immunopathology) , 33: 199-209 (1984)。正常およびカンジダ感染個体の血清中の抗カンジダ抗体の間には著しい差があった。ウィルツ (Hirz) ら、上記。

ポリサッカライドおよびペプチドに結合したポリサッカライドの抗ウイルス活性が観察された。スズキ (Suzuki)

ら、ジャーナル アンチバイオティックス (*Journal Antibiotics*)、32: 1836-1845(1979)。上記のスズキらはレンティヌス エドデス (*Lentinus edodes*) の培養菌糸体から抽出したペプチドマンナン (KS-2) の抗ウイルス作用を報告した。経口 (P.O.) 投与および腹腔内 (I.P.) 投与のいずれも、ウイルス感染に対してマウスを保護する最大血清インターフェロン活性を増加させる結果となった。これは、マウスに静脈内 (I.V.) または腹腔内 (I.P.) 投与した場合のみインターフェロンのより高い活性を引き起こすデキストラノースフュート (D.P.-40) [スズキ (Suzuki) ら、プロシーディングス オブ ザ ソサエティ フォー エクスペリメンタル バイオロジー アンド メディシン (*Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*)、149: 1089-1075(1975)] および 9-メチルストレブトイミドン (9-M5) [サイトウ (Saito) ら、アンチニア エージェント & ケモセラピー (*Anticancer Agent & Chemotherapy*)、10: 14-18 (1976)] とは異っていた。

アロエ ベラ ゲルの抗炎症活性は、口頭の証言および尊重されている科学雑誌の両方により広く報告されてきた。ルベル (Ruble) は、アロエ ゲルの抗炎症効果の可能な機構について十分論じた (*Cosmetics and Toiletries*)、98: 109-114(1983)。ウカイ (Ukai) らは、いくつかの固形の子实体から抽出したポリサッカライドにおける抗炎症活性に

注目した [ジャーナル オブ ファーマコロバイオ・ダイナミックス (*Journal of Pharmacobio-Dynamics*)、8: 883-990(1988)]。ポリサッカライドは、浮腫を引き起こすカラギーナンでの著しい阻害効果を証明した。ポリマーの 1 つである O-アセチル化-D-マンナン (T-2-HN) は、さらに、フェニルブタゾンより火傷の発癢過敏症におけるより顕著な阻害効果を証明した。ウカイ (Ukai) ら、上記。ポリサッカライドがタンパク質および脂質から遊離しているという主張は、抗炎症効果がアセチル化されたマンナンのみによることを強く示唆している。他の研究者達はまた、複合ポリサッカライド (サエキ (Saeki) ら、ジャバニーズ ジャーナル ファーマコロジー (*Japanese Journal Pharmacology*)、24: 109-118(1974)]、グリコプロテイン (アリタ (Arita) ら、ジャーナル オブ ファーマコロジー (*Journal of Pharmacology*)、24: 861-880(1974)] および硫酸塩化したポリサッカライド [ロカ (Rocha) ら、バイオケミカル ファーマコロジー (*Biochemical Pharmacology*)、18: 1285-1295 (1969)] の抗炎症効果について報告した。

ポリサッカライドが理学的および生理学的活性を有するという文献報告は、よく尊重される科学雑誌のページへ取り次いでいる。それ故に、アロエ ベラの粘液質のゲルが本質的にポリサッカライドであり、これがアロエ ベラの潤滑特性に秘密を持つことは非論理的ではない。ポリサッカライドがグルコマンナン、マンナン、ベクチンまた

はいくつかの他の組成物であるかどうかについての不一致は、化学的精製段階の結果である。本発明によるアロエの製造により、部分的にアセチル化されたポリマンノースが理学的活性を有する主要ポリサッカライドとして一貫して単離された。ヤギ (Yagi) らは、少し変形した抽出法を用いて、アロエ アルボレッセンス ミラー バー ナタレンシス (*Aloe arborescens Miller var. natalensis*) からアセチル化されたマンナン (アロエマンナン) を単離した [*Planta Medica*]、51: 17-20 (1977)。しかし、オボドバ (Obodova) は、同じアロエ種の主成分としてベクチンをより早くに単離した [*Khim. Prior. Soedin.*]、83: 83888(1975)。

上記で論じたように、ポリサッカライドの生物活性は長年の間認識されてきた。植物、イーストおよびバクテリアから回収したポリサッカライド物質は、ホストの防御系における増加を引き出すことにより、直接の生物活性を証明した。この反応は、他の抗原物質についての、増大したホストサーベイランスにより、第 1 に明示される。ポリサッカライドはアジュバント (フロイントラ) および免疫モジュレーター (*Immuno-modulator*) として働く。それらはまた、唯一の T 細胞非依存抗原として機能する。細胞免疫および体液性免疫の両方が影響され得る。そして、感染性の微生物および臓器細胞の食作用の増加が観察され、またこれはイムノグロブリンの生産を高める。

このような免疫学的に活性なポリサッカライドの構造および構造的な変化の型は、それらの有効性および毒性を制御する要因であるらしい。それらの活動の形式はほとんど理解されていないままである；しかしながら最近の証拠は、いくつかのポリサッカライドは、リンパ球およびマクロファージを誘導して広い範囲の免疫学的活性物質を生成することを示す。本発明の組成物は、これらの免疫学的活性物質のすべての特性を有している；それはすべての公知の生物活性ポリサッカライドの最も有効なものの中にあるが、毒性が観察されなかったという点で異なる。それはまた、ウイルス性のグリコプロテイン合成の変更を通して、固有の抗ウイルス活性を明示する。

本発明の概要

従って、単核細胞及びマクロファージ末梢血付着細胞によりインターロイキン I 及びプロスタグランジン E₂ の生産を活性化、誘発及び高める方法において、単核細胞及びマクロファージ刺激を行うに十分な量のアセマンナンを投与することを含む方法を提供することが目的である。

また、単核細胞及びマクロファージ末梢血付着細胞によりインターロイキン I 及びプロスタグランジン E₂ の生産を活性化、誘発及び高める方法において、アセマンナンが約 0.1mg/kg bwt/日～約 100.0mg/kg bwt/日の範囲で経口投与される、又は約 0.001mg/kg bwt/日～10mg/kg bwt/日の範囲で注射投与されるところの方法を提供することが目的である。

特表平3-501624(8)

また更に、哺乳動物においてマクロファージ食細胞溶解を刺激する方法において、単核細胞及びマクロファージ刺激を行うのに十分な量のアセマンナンを投与することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、哺乳動物において抗ウイルス作用を作る方法において、単核細胞及びマクロファージ刺激を行うのに十分な量のアセマンナンを投与することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、ヒトにおいて欠陥ウイルスを作る方法において、単核細胞及びマクロファージ刺激を行いかつウイルス感染細胞における複製代謝を変えるに十分な量のアセマンナンを投与することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、ワクチン生産のためのマスター細培養物において欠陥ウイルスを作る方法において、変化されたウイルス複製を作るのに十分な所定量のアセマンナンをマスター細培養物に加えることを含む方法を提供することが目的である。

また更に、アジュバント効果を作ることによるワクチンの免疫増強方法において、ワクチン投与量当たり約0.001mg～10mgの範囲の所定量のアセマンナンをワクチン製品に加えることを含む方法を提供することが目的である。

また更に、哺乳動物における腫瘍を処置する方法において、単核細胞及びマクロファージ刺激を行い、自然の殺細胞活動を高めかつ白細胞及び／又は抗体による特異的腫瘍

細胞溶解を高めるのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、(1)非感染細胞のゴルジ体中にアセマンナンを誘導して、ウイルス感染からの保護を該細胞に与えるところの変えられたグリコプロテインを起す、または(II)ウイルス感染細胞のゴルジ体中にアセマンナンを誘導して、該感染細胞中でのウイルス表現を破壊又は禁止するところのグリコプロテインを作る方法において、細胞の表面のグリコプロテインを変性するのに十分な量のアセマンナンを細胞中に誘導することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、ウイルス感染細胞のゴルジ体中にアセマンナンを誘導して、該感染細胞中でのウイルス表現を破壊又は禁止するグリコプロテインを作る方法において、アセマンナンがウイルスを非感染とするのに十分な量で細胞中に誘導される方法を提供することが目的である。

また更に、ウイルス感染細胞のゴルジ体中にアセマンナジを誘導して、該感染細胞中でのウイルス表現を破壊又は禁止するグリコプロテインを作る方法において、細胞がウイルス感染され、(I)感染前に細胞が持っていたよりも広い免疫応答を与える広域スペクトルの特異的抗体が産生されるようにする、又は(II)広域スペクトル抗体産生の速度を高めるのに十分な量でアセマンナンが細胞中に導入される方法を提供することが目的である。

哺乳動物において、増加された量のマンノースを細胞内

及び細胞外細胞代謝経路に与えて、ヒトまたは動物における吸収不良及び粘膜細胞成熟症候群を矯正する方法において、マンノシリルトランスフェラーゼ活性のミハエリス定数を加速することによってグリコプロテインの合成のための追加的マンノースを与えるのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供することが目的である。

また更に、哺乳動物においてウイルス感染細胞を、細胞母リンパ細胞により抗体依存性細胞溶解(ADCC)を開始するであろうその表面上で変性ウイルスグリコプロテイン抗原を表現するよう誘導する方法において、変性されたウイルスグリコプロテインを作りかつ上記変性されたウイルスグリコプロテインが、それらを抗体性抗体に曝す感染細胞の表面で表現されるようにするのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に感染細胞中へ投与することを含む方法を提供することが目的である。

また更に、ヒトの中にアセマンナンを誘導して、多発性硬化症に関連する症候群を低減する効果を作る方法において、ブラーク形成を低減し、かつ中枢神経系細胞において官能性組織でのブラーク置換を誘発するのに十分な量のアセマンナンをヒトに投与することを含む方法を提供することを目的とする。

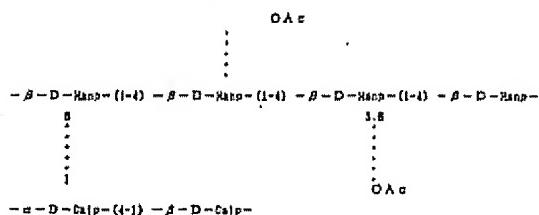
最後に、哺乳動物中にアセマンナンを誘導して、炎症性腸疾患に関連する症候群を低減する方法において、病巣中の潰瘍の組織再生を増大することにより及び病巣中の局部

的組織中の自己免疫免疫グロブリンの低減により、炎症性腸疾患に関連する病巣を解消するのに十分な量のアセマンナンを哺乳動物に投与することを含む方法。

カリシン(CARRISYN, 商標)は、アロエ・バルバデンシス・ミラーの葉の内部ゲルの精製したエチルアルコール抽出物に対する、本発明の發明人により与えられたブランド名である。カリシン抽出物の活性成分は、合衆国命名委員会により「アセマンナン」と名付けられた。カリシン抽出物の78%以上がアセマンナンである。カリシン抽出物は一般に、約78～80%のアセマンナンを含む。カリシン抽出物は一般に、葉の外側部を除去し、次に内側のフィレット又は粘液を取り出し、加工し、pH調整、エタノール抽出、凍結乾燥及び換くことにより作られる。米国出願シリアルNo.144,872(1985年1月出願、米国出願シリアルNo.889,281(現在は米国特許4,735,935)の一郎紹緒出願)を参照されたい。その開示を、引用することによりここに含める。この方法での加工により、共有結合は変えられず、従って活性化合物が作られないと我々は信じる。これら製造工程は、伝統的なアロエ製品製造者がこの多糖類を標準化し、安定化することができないことに因っていたという事實により示される問題を克服するために開発された。カリシン抽出物は、綿毛状の白色非晶質粉末であり、水及びジメチルスルホキシドに難溶であり、他のほとんどの有機溶媒に不溶である。この粉末は、粉状の(1～4)・D・マンノシリル単位より本質的に成る多糖類を78%以上含む。

特表平3-501624(9)

この多糖類は、酸素原子を介してポリマーに結合されたアセチル基をランダムに散在させた異性ポリマーである。このポリマーの総称がアセマンナンである。アセチル化度は、アルカリ性ヒドロキサメート法(ヘストリン、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー, 180: 240 (1948))で測定して、モノマー当たり約0.8個のアセチル基である。中性糖結合分析によると、70の糖に対し約1の比でD-ガラクトビラノースが、たぶん(1-6)結合を介して鎖に結合されている。マンノース対ガラクトースの20:1の比は、ガラクトース単位が、主に(1-4)グリコシド結合により互に結合していることを示す。アセマンナンの化学構造は下記のように示すことができる。



この粗成物を作り、この構造に到達するのに用いた方法の詳細な説明は、米国特許No.4,735,936 及び米国特許出願シリアルNo.144,872号に開示されており、引用することによりその開示をここに含める。

アセマンナンは、カリシン抽出物の生理学的活性成分で

れた単核細胞が循環系中に現われた。

今、アセマンナンは、培養物中でヒト末梢血付着細胞によるインターロイキン1 (IL-1) 及びプロスタグランジンE₂ (PGE₂) の有能な誘導剤であることが発見された。本発明は、IL-1放出の初めての実験的な非特异性刺激剤であると信じられる。インターロイキン1は、T-リンパ細胞、線維芽、B-リンパ細胞及び内皮細胞の活動及び産生に影響する、文献に報告されている重要なマクロファージ生産物である。J. J. オルド, 「チューマーネクロシス ファクター」, サイエンティフィック アメリカン, 1988年4月参照。また、G. ウィットマン, 「ディー アブソープション フォン DEAE デキストラン ディー オベルファッヒ フォン シュベインリンホツハイテン」, ツエントラルプラート フュールフェテリンアルメディツィン, 経日, 28: 577-580 (1979) 及びC. A. ディナレロン, 「バイオロジカル オブ インターロイキン1」, FASEB ジャーナル, 2: 108-115 (1988) を IL-1 の生理学的特性のために参照。IL-1は、偽治ゆを助ける線維芽増殖を誘導する。IL-1はまた、(1)エネルギーとしての脂肪の利用を低減し、食欲の衰退を起し(それはやせる剤として働かうる)、(2)骨髄活動を高め(それは骨髄が抑制された個人において治療的でありうる)、及び(3)一般に免疫系を高める。

混合リンパ細胞培養物 (MLC) での一連の実験による

あり、T-非依存抗原 LPS (リボポリサッカライド), FICOL, デキストラン及びレバーンと同じ化学的類に入る。T-非依存抗原は、多数の共通の特性を有する。特にそれらは、構造し抗原決定基を有する純て全く負に荷電している大きなポリマー状分子であり、それらの多くは高濃度において、その抗原に特異的なもの以外の巨細胞クローニングを活性化する能力を有する。即ち、それらはポリクローナル B細胞活性化を示す。ロイト, プロストフ及びメール, イムノロジー, 1988, ザ シー ブイ モスピーカンパニー, セントルイス, 8.3 及び 8.4ページ参照。

精製されたバルクのカリシン抽出物の少くとも73%は、10,000ダルトンより大きい分子量を持つアセマンナンの多糖類ポリマーより成る。

アセマンナンは、インビトロテスト系において突然変異原性でなく、芽体免性でない。アセマンナンのインビオ毒性研究は、犬における91日の単回性経口毒性研究及びラットにおける180日の慢性経口毒性研究を含む。これらの研究において、1日当たり 125mg/kgまでのアセマンナンを受けた犬に毒性効果は見られなかった。食料中に88.475 ppmまでのアセマンナンを受けたラットにおいて臨床的大きな病理性又は毒性作用は見られなかった。

バイオロット研究において、犬へのアセマンナンの投与は、完全白血細胞カウント及び形態的差異について採られた血液サンプルにおいて明白な単球増加を起した。アセマンナンの高投与量の経口投与後2時間内に、大きな活性化さ

と、アセマンナンは、投与量に依存する様でこれらリンパ細胞の同種抗原応答を増大する。単核細胞でのアセマンナンのインキュベーションは、単核細胞駆動シグナルがレクチンに対するTリンパ細胞応答を高めることを許した。MLCにに対するアセマンナンの作用についての関係する研究は、食団作用及び自然のキラー細胞活動の増大を示した。すなわち、これらインビトロテスト系において、アセマンナンは毒性和なく、免疫向上薬である。ナノグラム/ミリリットル量に対して敏感なELISAキットを用いて、検出し得るアセマンナン濃度は、IV投与後の犬の血液において検出された。濃度は極めて迅速に低下し、195分後にはほとんど検出できなくなった。マクロファージ/単核細胞系内でのアセマンナンの摂取及び濃度もまた測定された。

アセマンナンは、単核細胞分化モノキシン(monokines)の有能な刺激剤であり、また HIV感染単核細胞をしてスワインソニン(Swainsonine)と類似のメカニズムにより、活性化されたグリコプロテイン(GP-120)を作らせる。ツルシアニ(Tulsianni)らの *Journal of Biological Chemistry*, 257: 7930-7936 and Elbein et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 7393-7397 参照。アセマンナンは、食団され、明らかに単核細胞のゴルジ/グリコプロテイン領域へ供給されて、そこで直接にグリコプロテイン合成を妨害する。

アセマンナンは、ウイルス抗原に対する IgM 及び

IgG抗体の量を増加し、血漿中でのそれらの出現に必要な時間を減少させる。加えて、アセマンナンは、アロ応答性(alloresponse)を高め、食因作用を増大し、混合リンパ細胞培養物の自然のキラー細胞活動を増す。これらのメカニズムは、HIV感染患者における絶対CD-4(即ちT-4)カウントの増加ならびにそれらの併発感染に関連する症状の低減を説明しうる。アセマンナンでHIV感染患者を処置している医者は、HIV症状及び併発感染に関連する他の症状の高度に有意な低減を報告している。

HIV感染に対するアセマンナンの作用の様子は下記の組合せのようである。

- ・ キラー細胞の活性化による、感染された又は欠陥の細胞の破壊
- ・ 非感染性の欠陥HIVウイルスの産生
- ・ 高められた抗体産生
- ・ 他の抗原性物質に対する増大された、ホストの監視。

ブライアーホーリー臨床試験においてカリシン抽出物で現在処置されている20人のエイズ/ARC患者についての初期の情報は、母性、悪影響又は副作用の妊娠が見られなかつたことを示す。

アセマンナンは、標的細胞としてVERO単分子層を用いるウイルスブラークアッセイにおいてヘルペス及びはしかウイルスに対する抗ウイルス活性を持つことが報告された。該医薬は、感染しやすいリンパ細胞培養物のHIVウイルスによる感染を除かず、又はインビトロで逆転写酵素

活動を禁止しなかった。

アセマンナンは、エイズ、大腸炎、慢性潰瘍、腫瘍の処置において、及び新規な異例に有能なアジュバントとしての使用のために有用であると考えられる。アセマンナンはまた、ワクチン有効性向上から、免疫欠陥を作るまたは、他の点では健康な人において免疫検出が確立されるのを免れるところの病原性生物により起こされる病気の阻止及び処置までの幅広い分野において有用である。アセマンナンはまた、普通の風邪及びインフルエンザのいくつかの株の阻止及び処置において有用である。360日までの間、20オジンス/日の安定化アロエギュース(1ml当たり388~1109mgのアセマンナンを含む)を飲んだ15人のエイズ患者は、悪い作用なしに、HIV感染に関連する症候の有意な低減を報告した。20オジンス/日のアロエドリンクを消費した26人のHIV感染患者の別のグループは90日間観察され、悪い作用は見られなかった。

アロエドリンクで処置されたHIV陽性患者からのデータの作成及び分析によると、350日間観察された15人の患者において平均ウォルター・リード(Walter Reed) (修正)スコアは5.8~1.5の間であった。90日間観察された26人の患者の第二群において、平均スコアは2.98~1.76の間であった。これらと同ビニ群の患者における絶対CD-4リンパ細胞カウントは、夫々950から446へ、及び217から259へと上った。血漿コア抗原濃度の分析は、有意な傾向を示さなかった。15人の患者群からのデータの調査は、

アロエドリンクでの処置に対するHIV患者の応答を予測するための判定基準の開発をもたらした。これら判定基準を、アロエドリンクで処置されたHIV患者の第二群に予測的に適用すると、判定基準は一般に予測性があると判った。

図面の説明

第1及び2図は、アロエベラの葉の切開部分を示す。

第3~5図は、種々の濃度のカリシン抽出物で刺激されたヒト付着末梢血白血細胞(PBL)による、ヒトAB血球中のインターロイキン1(IL-1)及びインターロイキン1_Bの産生(肺臍細胞又はELISAアッセイにより測定)を示すグラフである。

第6図は、HIV(HTLV-III_B)のグリコプロティンコートに対するカリシン抽出物(アセマンナン)の作用を示すグラフである。

第7図は、その中でテストされる細胞が同系刺激を受けたところの混合リンパ細胞応答(MLC)におけるアロ応答(alloresponse)に対するカリシン抽出物の作用を示すグラフである。

第8図は、MLCにおけるアロ応答に対するカリシンの作用を示すグラフである。アロ応答は、同系応答の倍数としてプロットされる。

第9図は、トリチウム化チモジン挿入の非特異的MLC応答に対するカリシン抽出物の作用を示すグラフである。

第10図は、単核細胞・T細胞協同に対するカリシン抽出

物の作用を示すグラフである。

第11図は、各剤によるCr⁵¹放出の時間経過を示す。ヒト線維芽細胞の培養物を0.05% Granulex, Hibicrens, Betadine又はカリシン抽出物(CDWG)で種々の時間インキュベートし、放射性放出の合計のパーセントを測定した。データは、各時点において3~5個の夫々の測定の平均である。対照細胞(培地のみで処置された)は、30分間に合計Cr⁵¹の3~5%を放出した。

第12図は、細胞損傷に及ぶる濃度の影響を示す。培養された線維芽細胞を、種々の濃度のHibicrens, Granulex, Betadine又はカリシン抽出物(CDWG)と共に37°Cで15分間インキュベートした。放出されたCr⁵¹のパーセントを各濃度について測定した。対照放出(未処置細胞からの)は1~5%であった。データは、3~5つの別々の測定の平均である。

第13図は、クロムの放出: CDWG及び血漿の作用を示す。細胞は、培地単独(黒棒)、又はカリシン抽出物(0.5%)を含む培地(ハッチした棒)又は10%牛仔血清(ストライプを付した棒)を含む培地中で15分間インキュベートした。Betadine, Granulex又はHibicrens(0.15%)を加え、更に15分間インキュベーションを続けた。データは、3~4つの別々の実験の平均である。

第14図は、テスト第1群(パルス・マクダニエル群)でのテストにおいて850口服のアロエドリンク投与された15人のHIV感染患者において、絶対T-4ヘルバーリンバ

特表平3-501624(11)

細胞カウント (mm^3) における変化を反映するデータを示すグラフである。

第16図は、テスト第2群（ワトソン・マクダニエル群）でのテストにおいて90日間のアロエドリンク経口投与された26人のH.I.V.感染者における絶対T-4ヘルパーリンパ細胞カウント (mm^3) の変化を反映するデータを示すグラフである。

第18図は、上述の第1群（バルス・マクダニエル群）でのテストにおける350日間のアロエドリンク経口投与された15人のH.I.V.患者における修正ウォルター・リード臨床スコアを示すグラフである。

第17図は、上述の第2群（ワトソン・マクダニエル群）でのテストにおいて90日間のアロエドリンク経口投与された20人のH.I.V.患者における修正ウォルター・リード臨床スコアを示すグラフである。

第18図は、上述の第1群（バルス・マクダニエル群）でのテストにおける350日間に亘るアロエドリンク経口投与された15人のH.I.V.患者におけるp - 24pg/dLにおける血清コア抗原（アボット・ダイアゴノスティックス）を示すグラフである。

第19図は、第2群（ワトソン・マクダニエル群）における90日間のアロエドリンク経口投与された26人のH.I.V.患者におけるp - 24pg/dLにおける血清コア抗原（アボット・ダイアゴノスティックス）を示すグラフである。

第20図は、アセマンナン治療に対する応答において炎症

性脂症候群を有する患者の臨床評価スコアを示すグラフである。

第21図は、アセマンナン治療に対する応答において炎症性脂症候群を有する患者の内視鏡評価を示すグラフである。

第22図は、アセマンナン治療に対する応答において炎症性脂症候群を有する患者の粘膜生検評価を示すグラフである。

第23図は、アセマンナン治療に対する応答において炎症性脂症候群を有する患者のアセマンナンバイロット患者研究のまとめの表を示すチャートである。

第24図は、V.E.R.O細胞／はしかウイルス／アセマンナン・インビトロ系においてC.P.E.をブロックするために必要な濃度を知るためにアセマンナンの効率測定を示すグラフである。

第25図は、はしかウイルスによるV.E.R.O細胞の感染速度を時間に対して示すグラフである。

好ましい実施態様の詳細な説明

A. 毒性

アセマンナンの毒性作用はインビトロ及びインビトロ系で研究された。

アセマンナンは、アメス・サルモネラ・ミクロソームアッセイで突然変異原活性を調べられた。このアッセイは、Aroclor 1254誘発されたラット肝臓代謝活性系の存在下及び不存在下で、サルモネラ・チフィムリウム株TA1537、TA1538、TA98及びTA100を用いて行われた。アセ

マンナンは、これらアッセイ手順に従テストされたときに突然変異原性であるとは見られなかった。

アセマンナンは、細胞に対する毒性、アセマンナンにより起される幼若化反応、及びH.I.V.ウイルス及びH.I.V.感受性細胞への作用を評価するために、いくつかのインビトロテストに付した。予備研究において、標的細胞としてH-9細胞を用いて、非毒性濃度として0.2%のストック溶液の1:10希釈（最終希釈0.02%）を選んだ。標的細胞として正常な白血細胞を用いて非毒性レベルとして1:20希釈を選んだ。毒性研究によると、0.02%濃度のアセマンナンは、培地対照A群細胞と比べると、B群細胞に対して少しの刺激作用を有した。フィトヘマグルチニン（P.H.A.）と共にテストした剤（D群）は、P.H.A.単独（C群）と比べて少しの抑制作用を有した。これら観察された差は、重大とは考えられない。

アセマンナンのテストした濃度は、標的細胞のH.I.V.-I（以前のHTLV-III）による感染を実質的に禁止しなかった。いくつかの標的細胞は第0日にウイルスにより感染され、感染後3日から剤で処置された（III群）。また、他の標的細胞は、ウイルス感染の3日前に剤で処置され、剤の存在下で培養を続けた（IV群）。両例において、第7及び14日の逆転写酵素の比較で示されるように、培養対照ウイルスの高濃度にまでさえウイルス感染及び／又は複製が類似に見えた。第二の条件下で処置されたウイルスは、いく分低減された感染性を示したようであり、しかしこれ

は活性の過大推定の故に、处置されたサンプル点の不十分な希釈はテストの正確な結果を得ることを許さなかった。

およそその投与量範囲を決めるための14日毒性研究は、Sprague-Dawley離乳したてのラットを用いて行われ、カリシン抽出物（アセマンナン）の毒性効果を評価し、次に6ヶ月半慢性研究のための投与量並列を決定した。10匹の雄及び10匹の雌ラットの群の間に0, 500, 12500, 25000 及び50000ppmのカリシン抽出物の投与レベルを与えた。全ての動物を、毒性の徵候、動き及び死亡について毎日観察した。体重及び飼料消費を毎週測定した。臨床化学及び血液学バラメーターは、終了時に測定した。最後の死体検査は、2日間にわたり行った。器官重量を測定し、選んだ組織を10%の中性緩衝されたホルマリン中に保った。化合物に関連する変化は、臨床的徵候、体重、飼料消費、血漿学、臨床化学又は器官重量において見られなかった。全體の病理学的検査は、非化合物関連変化の発生を示さなかった。従って、Sprague-Dawleyラットは、少くとも2週間の食餌中で5%までカリシンに耐えうるようである。

ラットでの別の研究において、2週間（14日）のアセマンナンの標的細胞投与において用いるために、80匹のCharles River CDラットを夫々5匹の雄と5匹の雌の6群にランダムに分けた。カリシン抽出物（アセマンナン）を、下記の投与量（处置）：500, 1000, 2000, 3000及び5000mg/kg体重/日を与える量で飼育油キャリア中に懸滴した。対照は飼育油キャリアのみを受けた。全ての处置は、

特表平3-501624(12)

20ml/kg体重の一定量で強制経口投与された。全ての動物は、雌性、病気及び死亡の明白な徵候について少くとも日に二度観察され、詳しい観察は週に少くとも一度行った。個々の体重及び飼料消費量を毎週記録した。2000及び6000mg/kg/日群の夫々において1匹の雄および5000mg/kg/日群における2匹の雌を含む5匹のラットが死んだ。死んだ1000mg/kg/日群の1匹の雌は、先立つ異常な徵候を示さなかった。他の4匹のラットのうち、少くとも2匹は通常呼吸、口の周りの赤い発色、脱水の減少を示し、触ると冷たかった。最も多い投与の群における全ての雄及び3000mg/kg/日群における2匹の雌において第2週に腹の膨脹が見られた。異常呼吸は、1000、2000、3000及び5000mg/kg/日投与レベルで殆んどの動物で、特に第2週に見られ、また 6000mg/kg/日投与レベルの1匹の雄で見られた。体重及び/又は飼料消費は、対照群と比べて5000mg/kg/日の雄及び雌ラットにおいて低減した。いくつかの動物で見られた呼吸抑制及び腹膨脹は、テスト品の化学的性質ではなくてテスト品/油混合物の物理的性質に關係すると考えられた。ラットが、胃を正常に空にするまで十分に物質を消化できなかったということはありうる。膨脹した胃が肺に侵入して、呼吸抑制を起した。

急性研究において、5匹の雄と5匹の雌ラットが、5000mg/kgの投与レベルでテスト品カリシン抽出物（アセマンナン）を1度経口投与された。テスト品は、20ml/kgの量の綿葉油中v/v懸滴物として投与された。15日研究期間の

中性緩衝されたホルマリン中に保存し、これら組織のヘマトキシリン及びエオシン着色スライドを顕微鏡で観めた。全ての犬からの選んだ器官を、絶対及び相対的器官重量の決定ならびに器官・脳重量比の計算のために秤った。処置した動物で見られた臨床的徵候は、偶発的出来事又は対照動物における同等の厳しさの故と考えられ、化合物投与に關係するとは考えられなかった。化合物に關係する変化は、体重、飼料消費、臨床化学、尿又は電気泳動パラメーターにおいて見られなかった。単核細胞の絶対数の増加へのありうる傾向は、24時間隔続採血で見られたが、しかし雄犬においてのみであった。平均の絶対及び相対器官重量は、対照犬と化合物処置犬とで同等であった。全ての総合的及び顕微鏡的死体検査所見は、同じであると考えられ、化合物投与と關係しなかった。

B. 病理学

アセマンナンの病理学的挙動と作用を、種々のインピクト及びインピボテスト系で研究した。

カリシン抽出物（アセマンナン）は、抗HIV及び抗マンノシダーゼ活性について評価された。用いたテスト系において、アセマンナンは抗ウイルス活性を持つと示さなかった。アセマンナンは、テストした最高濃度（1000ng/mL）で培養物でMT-2ヒトリンパ細胞の約43%を保護し、マンノシダーゼの抑制を示さなかった。アセマンナンは、グリコシル化（GP-120形成）を防がず、しかしHIV-Iウイルスのより大きい及びより小さい分

处理の評価基準は、死亡、病理毒性徵候、体重及び病理学（全體的死体検査で決定）であった。どの動物にも、テスト品に關係する毒性の証拠は見られなかった。テスト品のLD₅₀値は、雄および雌ラットに一度経口投与された場合、5000mg/kgより大きいと判った。同じ結果が、5匹の雄および5匹の雌マウスを用いて同じ手順で行って得られた。

犬での91日半慢性毒性研究をカリシン抽出物（アセマンナン）を用いて行って、経口投与後の毒物学的応答を評価した。研究は、0、100、400 又は1500mg/kg/日の経口投与量でカリシン抽出物（アセマンナン）を受ける4匹の雄と4匹の雌の純血ビーグル犬の4群より成了。1時間の給餌期間に犬により消費されると予期される飼料の量中に各犬の所定投与量を与えるのに十分な量のテスト品量を入れることによって、物質を毎日投与した。与えられた飼料の量は、前日の飼料消費に基づいた。全ての犬が理論投与量±10%を受けた。犬は、予備テストの間、1週間間隔で、そして最後の死体検査の前に体重測定した。飼料消費は、投与1週間前から毎日測定した。病的状態、死亡及び毒性徵候は、開始前及び投与中、毎日モニターした。臨床化学、電気泳動、血球学及び尿パラメーターは、予備テストの間、45日後、そして終りの前に測定した。第88回の投与後には、24時間にわたり等間隔で高投与及び対照犬から血サンプルを採取して、白血細胞パラメーターのありうる変化を評価した。全ての犬が研究の終りまで生き残った。終了時に犬は、完全な総合死体検査を受けた。選んだ器官と組織を10%の

子量のグリコプロテインの多数の放射ラベルされた帯を作った。アセマンナンはまた、全ての濃度で細胞成長促進活性を示した。生体染料摂取は対照の 140% 及び 158% であった。HIVに対する直接的活性を示さないけれど、アセマンナンは、免疫刺激特性を持つと結論された。

アセマンナンは、ヘルペス・シンブレックスウイルスに対して標準備抗ウイルス ブラーケアセイでテストされ、0.771 ng/mLのアセマンナン濃度で抗ウイルス作用が見られた。この濃度は、或る免疫系において容易に達成しうる。

VERO（グリーンモンキー細胞）細胞の感染されやすい培養物にウイルスを加える前にアセマンナンの種々の濃度ではしかウイルスを予備インキュベートした場合、2.5 ng/mLのいき値濃度でウイルスの細胞変性作用の不存在により示されるように、アセマンナン処置されたウイルスはVERO細胞を感染しなかった。CPEの完全な不存在は、ウイルス接種における5倍/孔のアセマンナンで達成された。アセマンナンでインキュベートされたアセマンナンでインキュベートされた細胞は、はしかウイルスに曝されたVERO細胞培養物においてアセマンナンの抗ウイルス活性を増大した。唾液処理されたアセマンナンは、抗ウイルス活性における5倍もの増加を示した。別の評価では、VERO細胞は、アセマンナン5 ng/mLの添加前に種々の時間（0.5～6時間）はしかウイルスの40TCID/mLを含む培地でインキュベートされた。しかし、この評価において、細胞がはしかウイルスに曝された後のアセマン

特表平3-501624 (13)

ナンによるインキュベーションは、V E R O細胞を感染から保護しなかった。

アセマンナンの種々のポリマー鎖長のヘルペスウイルスへの作用を調べるために、中空錐維サイズ排除限外濾過によりポリマー鎖長を分離した。得た鎖長部分を、ヘルペスシンプレックスⅡウイルスによるV E R O細胞培養物の感染を防ぐそれらの能力に従って評価した。この系において、V E R O細胞への最大の保護は、8000ダルトン未満の分子量を含む部分により与えられた。

V E R O細胞単層は、培地中で5 mg / mlのアセマンナンにより2, 4, 8及び12時間処理された。次に単層をアセマンナン不含の培地で洗った。夫々の処理された単層に40 T C I D / mlのはしかウイルスを加え、培養物を5日後に細胞変性について調べた。アセマンナンによるV E R O細胞の予備処理は、はしかウイルス感染を防がなかった。

H I V 感染した末梢血リンパ細胞により作られたウイルスの数を定量するため及びその感染性を評価するために、実験室的手順を考察した。このフロフィールには、細胞がH I V 感染を受けたことのインジケーターとして抗体免疫蛍光 (A C I F) 株、作られた抗原の量を評価するためのH I V p 24コア抗原アッセイ、及び生理学的に活性な感染性ウイルス抗原性の定量的インジケーターとしての逆転写酵素アッセイが含まれた。培養物中の細胞の成長及び生存性を評価するために、細胞密度及びトリパンブルー染料除外テストを用いた。これら実験の結果は、アセマン

ナンがH I V の複製を逆転写酵素禁制を介して直接に禁じなかつたことを示唆した。

生物学的系へのアセマンナンの移入又は吸着を追跡するために、ヒト末梢血単核細胞培養物及びC¹⁴ラベルされたアセマンナンを用いて研究を行つた（実施例23以降）。この研究で、検出しうる量のC¹⁴ラベルされたアセマンナンが、ヒト末梢血単核細胞／マクロファージ細胞により吸着又は取り入れられた。移入のピークは48時間に起つた。5 mg / ml濃度のC¹⁴ラベルされたアセマンナンは、単核細胞／マクロファージ細胞に対し細胞毒でなく、重量／体積(v/v) 単位での消化された細胞量は、消化されたアセマンナン溶液のv/vの780倍大きかった。これらの結果は、マクロファージ細胞が、細胞毒性でない極めて高い濃度でのアセマンナンの細胞内濃度を可能にすることを示唆する。

ヒト患者及び動物の血清における逆転写酵素アセマンナンの検出のためのE L I S Aキットを調査するための実験が、3 mg / kgのアセマンナンI Vを与えた15匹の犬から得た血清サンプルについて行われた。結果は、アセマンナンが血清中で検出可能であり、血から迅速に除かれることを示した。アセマンナン注射後195分に採られたサンプルは、極めて低濃度を含んだ。局所外使用のためのアセマンナンの適合性を評価するために、2匹のラビットに5 mgのアセマンナンI Vを与えて、注射の1及び2時間後にラビットにおける何らかの明らかな効果及び白血細胞形態の何らかの変化を調べた。アセマンナンは、いずれのラビットの物理

的状況においても観察しうる臨床的变化を起さなかつた。1匹のラビットからの血サンプルは、未知の理由により(たぶん欠陥あるE D T A管の故に)凝固した。別のロットのE D T A管が他のラビットについて使用され、血サンプルは凝固しなかつた。注射2時間後に調製された血塗抹スライド上の多数大きな単核細胞の存在は、アセマンナンに帰された。

皮内注射後のアセマンナンのかゆくする特性を評価するために、皮膚テストをラビットに対して行った。1 mg / mlテスト溶液の0.1 mlの注射後にテスト物質のいずれに対しても皮膚の又は全身的反応は見られなかつた。

米国特許X X I 、生理学的テスト【151】に概要を示された発熱源テストプロトコルに従い、アセマンナンの1 mg / ml注射する溶液を用いて、ラビットにおいて発熱源アッセイを行つた。注射されたアセマンナンのうちの精神的作用の故に、米国特許に記載されているよりもひんぱんな温度測定を行つた。テスト動物における変化は米国特許プロトコルにより許された最小変化を越えなかつた。従つて、この溶液は発熱源存在の米国特許の要件を満たす。注射し得るアセマンナンは、1匹のラビットにおいて測定された0.3°Cの体温上昇を誘発した。この温度上昇は注射の90分後に起こつたことに注意されたい。アセマンナンはインビトロのマクロファージ及び単核細胞によるインターロイキン・I (I L - I) の誘発剤である。I L - Iは潜在的な発熱原であるので、このことはこのラビットにおける

最少の遲延体温上昇を説明し得る。

動脈内脳底のためのアセマンナン溶液の適合性を評価するため、注射し得るアセマンナンの1.5 mlの投与量(1 mg / ml)をラビットの取の中心動脈中に困難なく注射した。動脈により供給される組織は注射の後24時間、48時間または7日間後に何らの大きな変化を示さなかつた。注射し得るアセマンナンは、濃厚な粒子懸濁物を形成するけれども、該物質は局所的組織により、良好に耐えられる。そして、耳先端の毛細血管をつまらせなかつた。

I P 注射されたアセマンナンの大きな投与量が不快の徵候または体温の上昇を誘発するかどうかを見るために一つの実験がまた行われた。直腸温度を含む基本的な臨床的／物理的検査は二匹のラビットにて行われた。ラビットは5 mlのアセマンナン溶液(1 mg / ml)またはアセマンナンテスト物質を希釈して調製するため用いるのと同じ規定度の食塩水の5 mlのI P注射を受けた。ラビットは注射の1, 2, 24, 及び48時間後に物理的変化、不快または体温上昇の徵候について調べられた。テスト物質のいずれにも反応が検出されなかつた。

ヒト末梢血付着細胞に対するアセマンナンの作用を調べるために、インビトロアッセイを行つた。アセマンナンが単核細胞及びマクロファージによるインターロイキン・I 及びプロスタグランジンE₂の生成の有力な誘発剤であることが確認された。

四匹の雌種犬にC A R R I S Y NTH抽出物(アセマン

特表平3-501624(14)

ナン) の単一投与量を与えた床的微候及び実験室的血液パラメーターの変化を観察した。投与された CARRISYNTH 抽出物の投与量は体重 1 kg当たり 15~1500 mg であった。対照のイヌはプラシーボ投与及び触しんを受けた。次に同じ五匹のイヌを CARRISYNTH 抽出物による 93 日経口投与プロトコールに付した。選ばれた投与量は 150 mg/kg/日 であった。二つの研究において、処置された及び対照の犬は挙動において及び臨床検査の結果において変化を示さなかった。テスト品の投与とともに変化すべき観察された唯一の測定された変化は白色細胞増加カウンティングの間に記録された階層する単核細胞の増加であった。これら単核細胞のいくつかは、それらが血液スライド上に見られる他の単核細胞よりも大きい故に、活性化されているようであった。研究の終わりにおける他の犬の死体検査及び疫学的検査は何らの異常な所見を示さなかつた。

犬に経口的に投与されるアセマンナンのための可能な生理的マーカー (増加された数の増加する単核細胞) を評価するために行われた研究において、20匹のビーグル犬 (10匹の雄及び10匹の雌) を三つの処理群に分けた。CARRISYNTH 抽出物 (アセマンナン) を 0.05, 0.6 または 5.0 mg/kg の投与量で経口投与した。血液塗抹をアセマンナン処理の前及び処理後 1, 3, 5, 7 及び 24 時間後において WBC カウントの合計及び差について調べた。合計 WBC 及び単核細胞カウントが 0.6 及び 5.0 mg/kg 処

理群において増加した。単核細胞はアセマンナン投与後 7 時間で最大であった。この潜在的なこの可能性ある生物学的マーカーのための無効果投与レベルは 0.05 mg/kg であった。

アセマンナンは他の実験において単核細胞機能を高めるように見えたので、アロアンチゲンの免疫応答を高めるアセマンナンの能力をテストするために及び潜在的向上が単核細胞により起こる現象であるかどうかをテストするために研究を行った。アセマンナンは混合されたリンパ細胞培養物 (MLC) において同系抗原に対するリンパ細胞応答を高めず、しかしそれは投与量に関係する懸念で、アロ抗原応答を著しく高めた (2.0×10^{-7} ~ 2.0×10^{-9} M)。アセマンナンのこの効果は特異的応答であるように見える。また、アセマンナンのインビトロモードと共に起きる、これはまた、インビボにおいても達成される。別の一連の混合実験によると、単核細胞によるアセマンナンインキュベーションは単核細胞により起こされるシグナルがレクチンに対する T 細胞応答を高めることを可能にする。アセマンナンはそれがアロアンチゲンに対するリンパ細胞応答を高める点において免疫向上剤であると結論された。メカニズムはアロアンチゲンの保護の下で、IL の単核細胞放出の向上を含むことが示唆された。このメカニズムは動物及びヒトにおいてビールス感染を阻害するアセマンナンの最近観察された能力を部分的に説明し得る。

CARRISYNTH 抽出物 (73~90% アセマンナン) の

効果は、食作用機能への効果を確認するためにインビトロで研究された。CARRISYNTH 抽出物は CBA マウスに IP 注射され、腹腔及び脾臓マクロファージが三日後に摘められた。チオグリコレート及び食塩水を陰性及び陽性対照として夫々同様にテストした。抗 SRBC タイマーの存在下及び不存在下で摂取粒子として赤血球細胞 (SRBC) と共にマクロファージをインキュベートし、SRBC を摂取した細胞百分率でマクロファージを組織学的に測定した。CARRISYNTH 抽出物処理後に非特異的食作用が少し増加したけれど食作用は抗体の存在下で少し侵された。抗体の存在下で CARRISYNTH で刺激された抗体による食作用はかなりの程度に増加された。それらの結果は CARRISYNTH 抽出物がマクロファージの数を増加させ、そしてそれらの食作用活性を増加させたことを示す。そのような応答は傷治術の刺激剤として及び抗感染剤としてのその有効性に掛けられ得る。

CARRISYNTH 抽出物 (アセマンナン) で刺激されたマクロファージはまた、非特異的腫瘍の死に対して刺激された食作用の効果を測定するためにインビトロ及びインビボで、チオグリコレートで刺激された及び対照のマクロファージと比較された。Cr⁵¹標的細胞と共にインキュベートされたチオグリコレートで刺激されたマクロファージは平均 2800 cpm で Cr⁵¹を放出し、一方、CARRISYNTH 抽出物でラベルされた細胞は平均 3100 cpm の放射線を放出した。これら群の間に統計的な差異は

なかった。刺激されなかったマクロファージは 2800 cpm の範囲で放出した。しかし、CARRISYNTH 抽出物でインビトロで刺激されたマクロファージは 21000 cpm の Cr⁵¹放出を示した。このことは二つの明らかな事実を示した。CARRISYNTH 抽出物は長期間続く細胞分解作用を誘発せず、その活性は粗概略表において比較的短い時間生じる。細胞毒性パーセントは cpm と比例する。続く実験は経時的な細胞活性アッセイを用いて行われた。細胞毒性作用は刺激後 6 時間と 12 時間でその最大に増加することが示された。この活性化のメカニズムは研究されなかった。これら研究において示されたデータは CARRISYNTH 抽出物 (アセマンナン) が癌の非特異的治療において重要な役割を持ち得ることを示した。

ネコ族の病気に対して以前ワクチンを受けていない 10~20 遅齢の二十四の健康なネコを、ネコビールス鼻氣管炎の処理におけるアセマンナンの有効性の研究のために選んだ。十匹のネコを CARRISYNTH 抽出物 (アセマンナン) の一回の経口投与 (15 mg/kg) で処理し、他のものはアセマンナンなしの (陰性) 対照として用いた。アセマンナン投与の 4 時間後には、ネコは鼻氣管炎ウイルスに鼻孔内でさらした。全ての非処理ネコは病気の徴候を示し、一方十匹のアセマンナン処理動物の何か二匹が、臨床的徴候を示した。また、後者の群の二匹の影響されたネコは病気の緩和された症状を示した。

特表平3-501624(15)

C. 投与の形態

アセマンナンの物理的特性は、当業者に知られている全ての剤剤投与形態にアセマンナンを処方し、加えることを可能にする。生きた生物の組織及び機関においてそれを用いること及び広い範囲の投与量で付与することを可能にする。

アセマンナンは一日当たり体重1kg当たり0.001mg～1000ugの毎日の投与量で経口的に腸管外に、局所的及び部分的に付与することが出来る。

アセマンナンを適当な助剤と混合して、錠剤及びコートした錠剤のような固体の投与単位へと圧縮または充填することが出来、あるいはカプセルにすることが出来る。経口投与は投与形態は一日当たり体重1kg当たり約0.1～100ugの投与量で投与されるであろう。

適当な液状ヒビクリルを用いてアセマンナンは溶液状態物またはエマルジョンとして注射され得る。これら製品は一日当たり体重1kg当たり0.001～10mgの速度で投与される。ワクチンまたは他の製品のアジュvant成分としてアセマンナンはアジュvant製品の単位投与量当たり0.001～10ugの速度で用いられるであろう。

一般に、アセマンナンは少なくとも10g/kg体重/日が利用出来るような任意の形態で投与される時、ヒトにおいて有効となる。

アセマンナンの局所的投与は、加工されたゲル、クリーム、ローション、溶液、軟こうまたは粉末の形であり得る。

で24時間培養した、上澄み液を採取し、細胞を除去するために遠心分離し、500倍積のPBSで48時間（一回変えた）透析して、引き続きた前記のように25mlのHepes、抗生素質及びL-グルタミンを含有する20倍積のRPMI・1640で4時間透析した。IL-1の活性を評価するまで、上澄液は-20°Cにて冷凍された。

B. 上澄液中のIL-1の定量

IL-1を分析するために、二つの異った方法が用いられた：(1)胸腺リンパ球分析、及び(2)IL-1に特異的なELISA分析。

1.5～8週齢のC3H/HeJマウスからのチモサイトが用いられた。5%のFCS、100U/mlのベニシリソ、50g/mlのステレブトマイシン、2mMのL-グルタミン及び 5×10^{-2} Mの2-メルカプトエタノールを含む最低必須培地(MEM)中で、均一な細胞分散液を調製した。細胞の濃度を、細胞/くぼみが 1×10^6 となるように調整し、96-くぼみのプレートに分配した。PHAを各くぼみに10g/kgくぼみの濃度で加えた、引き続いて試料を希釈し、最終希釈度1:10から出発して、25lの体積が各くぼみに加えられた。全ての希釈物は四回試験された。プレートは5%CO₂を含む満った雰囲気中で37°Cにて72時間培養され、最後の16時間は[H3]-チミジン(0.5Ci/kgくぼみ)がバルスされた(pulsed)。細胞を自動細胞採取機にてファイバーグラスフィルター上に採取し、標準シンチレーション法により放射能を測定した。第3図及び第4図は二

これら処方は、00%までのアセマンナンを含むことが出来た。

実施例 1

カリシングで刺激されたヒト付着性末梢白血球による、インターロイキン・1及びピグマリー2(PGE₂)の生成

A. IL-1生成の説明

Ficoll-Hypaque【スウェーデン(Sweden)、ファルマシア社(Pharmacia)】中での密度変化遠心分離(density-gradient centrifugation)により、ヘパリンで貧血を防いだ全血液からヒト単核細胞を分離した。洗浄後、50U/mlのベニシリソ、50g/mlのステレブトマイシン、及び2mMのL-グルタミンの加えられたRPMI・1640中に、細胞を25mlのHepesと共に 2×10^6 mlの濃度に再分散した。細胞分散液2mlの回分を6-くぼみ(six-well)のプレートの各くぼみ(well)に分配し、5%CO₂及び湿気を含んだ雰囲気中、37°Cにて1時間培養した。粘着していない細胞を除去した後、付着した細胞を上記の培地で3回洗浄した。各くぼみに、5%のブルーされたヒトAB血清が加えられた培地2mlを加えた。培養液は第3～5回に示されたようにして、満った濃度のCARRISYNTH抽出物で刺激された。同時に、大腸菌【シグマ(SIGMA)0111:B4】からのリボポリサッカライド(LPS)を、いかなる添加物を加えることなく、最終濃度20g/mlに保つ対照を加えた(バックグラウンド)。培養液を上記のようにして37°C

での別々の実験の結果を示す。結果は、最終的な希釈度1:10での上澄液に応じた胸腺リンパ球によるチミジンの導入のcpmとして表されている。

2. IL-1のためのツーサイト“サンドイッチ”ELISA

この方法は、最近、ジャーナルオブイミュノロジー(Journal of Immunology, 138:4238, 1987年)に掲載された。同様に、米国特許第3,654,090号及び米国特許第31,008号(シュールス(Schuurs)他)を見よ。手短かに言うと、IL-1に対するモノクローナル純化抗体purified antibody IL-1-H6(100L/くぼみ、10g/ml)をビニル分析プレートのくぼみ上、4°Cで一夜コートした(coated)，該くぼみをPBS/0.5%Thinnerosalで洗い、5%の脱脂粉乳/0.5%Thinnerosal/PBS 200lで室温で1時間カウンターコートした(counter-coated)。洗浄後、50l/くぼみの試料、すなわちヒト粗損体IL-1標準、及びIL-1の重複しないエピトープ(non-overlapping epitope)に対する他のモノクローナル抗体、1%脱脂粉乳/0.5%Thinnerosal/PBS中のビオチン化されたILB1-H87(2g/ml)50lを加え、該プレートを室温で2時間培養した。洗浄後、1:1000希釈度のステレブタバイシン-ペリオキシダーゼ100l/くぼみを加え、該プレートを1時間培養した。くぼみを洗浄し、100lのOPD基質溶液と共に暗所で30分間培養し、450nmでの吸光度を測定した(第5図)。

特表平3-501624(16)

第 1 頁

C. PGE₂ の定量

プロstagランジンE₂は、未透析の上澄液と同じく、ラジオイムノアッセイで測定した。製造元の教示に従い、PGE₂に対する抗体（アイシーエタ バイオメディカル社（ICH Biomedical, Inc.）, コスタ メサ(Costa Mesa), カリフォルニア(CA)）を使用した。

D. 観測

典型的な実験が第3図～第5図及び第2表に示されている。CARRISYNTH抽出物はヒト付着性末梢白血球によるIL-1構造の強力な誘発物である。1～10g/mlの間の量で、CARRISYNTH抽出物は、20g/mlのLPS（このものはIL-1生成の標準的な誘発物である）によって誘発されるに匹敵するIL-1生成を誘発した。CARRISYNTH抽出物は、同じ量の範囲にてもまた、20g/mlのLPSによって誘発されるに匹敵するレベルでのPGE₂の生成を誘発した（正の対照）。

CARRISYNTH及びリボボリサッカライド(LPS)によって刺激されたヒト末梢血白細胞によるプロstagランジンE₂生成の誘発

実験番号	刺激物	PGE ₂ ng/ml
108	0	0
	LPS 20g/ml	2.6, 3.9
	CARRISYNTH 10g/ml	3.6
	CARRISYNTH 1g/ml	0
148	0	0
	LPS 20g/ml	0.6, 1.3
	CARRISYNTH 10g/ml	0.7

実施例 2

インビトロでの食菌作用におけるCARRISYNTHの作用

CARRISYNTH抽出物（78%アセマンナン）の作用をインビトロで研究して、食菌機能に対するその作用を確認した。CBAマウスにCARRISYNTH抽出物を皮下注射した。そして、腹腔及び脾臓マクロファージを3日間後に採取した。ポジティブ及びネガティブ対照として、チオグリコレート及び食塩水を夫々同様にテストした。抗SRBCタイターの存在下及び不存在下で採取粒子とし

て、ヒツジ肺血細胞(SRBC)によりマクロファージをインキュベートし、食菌作用を粗獣学的に測定して、SRBCを採取した細胞のパーセントとして示した。CARRISYNTH抽出物の処理の後に、非特異的な食菌作用が僅かに増加したが、食菌作用は抗体の存在下で有意に増加された。抗体の存在下で、CARRISYNTHで刺激された抗体による食菌作用は相当の程度まで増加された。これらの結果は、CARRISYNTH抽出物がマクロファージの致を増大させ、それらの食菌活動を高め得ることを示す。そのような反応は、傷の治癒の刺激剤として及び感染防止剤としての有効性に寄与し得る。

A. 方法及び材料

CARRISYNTH抽出物（アセマンナン）は、その乾燥された形で室温で貯蔵された。夫々の実験に必要な量で秤られ、600ワットの出力で2分間マイクロウェーブにさらした。それを殺菌されたプラスチックの遠心分離チューブに移しから1分間マイクロウェーブにかけた。この物質を、細胞培養液培地(RPMI-1040)で所定の濃度まで希釈した。

食菌細胞：マウス脾臓細胞は、ハーラン スプラー グ・ダウレイ(Harlan Sprague-Dawley)から購入したBALB/cマウスから得た。マウスはCO₂で殺し、それらの脾臓は無創的に取出された。次に、細胞をジャーナル オブ イミュノロジー, 71, 220(この開示を引用することにより、ここに含める)の方法に従いナイロンウール

カラム分画により、付着及び非付着集団に分離した。付着細胞を下記のように顕微鏡分析により測定し、マクロファージ（単核細胞）及びリンパ球が、4:1の比であった。単一細胞懸滴物を、単分子層破壊により得た後、付着及び非付着の両者の単一細胞の標本を、ファイコール・ハイパーク(ficoll-hypaque)に配置し、遠心分離して、リンパ球とマクロファージの混合物を得た。

幼若化アッセイ：標準的な幼若化アッセイは、以下のようにして行った。アッセイで用いたマイトイエンは、ブルーウェルカム(Burroughs Wellcome)から得たPHP-Pであった。個々の実験について示したように、培養物は5%CO₂中加温二氧化碳下で72時間保持された。トリチウム化した(tritiated)チモジンを培養の最後の6時間の間に加えた。フラットボトムマイクロタイマー粗面培養プレートを用いたくぼみ当たりの細胞濃度は 5×10^5 マウス細胞/0.2mlであった。細胞は最初にくぼみに入れられ、次にCARRISYNTH抽出物またはマイトイエンを加えられた。刺激指数(S.I.)は、下記の式を用いて計算した

$$S.I. = \frac{cpm \text{ 実験値} - cpm \text{ バックグラウンド}}{cpm \text{ 対照} - cpm \text{ バックグラウンド}}$$

細胞着色：簡単に説明すると、細胞の塗抹標本は下記のようにして、非特異的エステラーゼにより着色した。二滴中の約 2×10^6 細胞を小牛血清二滴及び5%ホルムアルデヒド25ml、アセトン45ml、KH₂PO₄ 100mg、

Na_2HPO_4 10mg 及び水30mlの混合物より成る固定溶液4滴を混合した。スライドを、10mgのナフチルアセテート、及び0.1Mトリス・マレエート緩衝液、pH7.0を伴うエチレングリコールモノエチルエーテル 1.4ml中ファストブルー ステイン (Fast Blue stain) 4.5g の混合物 (ライトのステイン (Wright's stain), ジャーナル オブ ヒストケミストリー (Journal of Histochemistry), 21:1-12 [1973]) でもって、インキュベートした。ステインを10分間反応させ、次に20秒間水で洗った。再び洗浄する前に、Giemsa 0.2g、エタノール12.5ml及びグリセロール12.5mlの対比着色を30秒間行った。

脛腔マクロファージ細胞の誘発:食塩水チオグリコレートプロスまたはアセマンナンを雄BALB/cマウスに腹腔内注射して腹腔浸出マクロファージ細胞を誘発した。誘発された細胞は、3日間のポスト注射後に腹腔から取出した。

マクロファージをホスフェート乾燥した食塩水 (PBS) より二回洗い新鮮な培地2mlで覆った; マクロファージ懐液物 0.1mlを各試験管に加えた。培養物を37°C、加温、5%CO₂ 85%空気インキュベーター中、30~60分間置いた。培養物をPBSで2度洗い、PBS 2mlで覆った。一封のカバースライドの一つを針状先端のピンセットで取除き、蒸留水のみの中に5秒間浸漬し、そして、素早く培養皿に置いた。PBSを除きそして培養物を氷冷グルタルアルデヒドで覆った。10分間後にグルタルアルデヒドを取除き、

カバースライドを蒸留水に入れた。

セットしたカバースライドを、位相差顕微鏡の油浸レンズにより、素早く調べた。没透圧ショックを受けなかったスライドにおいてアッティメントを数え、一方、紙取は蒸留水ですがれたカバースライドにおいて数えた。

抗体依存性及び抗体非依存性食餌作用:オーステンバイオロジックス ラボラトリー (Austin Biologics Laboratory, オーステン (Austin), Texas(テキサス)) から得たヒツジ赤血細胞 (SRBC) をPBS (pH7.2) 中で3度洗った。BALB/cマウスに 10^6 細胞のIP注射をして、14日ポスト注射により飼育した。血清を集め、アルシ、50°Cで45分間熱失活させた。丸底マイクロタイマーくぼみを用いて競争タイマーを測定して1024であった。

抗体依存性食餌作用は、20%小牛血清 (FCS) を含む RPMI-1640中でマクロファージ (10^6) と共に SRBC (0.5%v/v) のインキュベーションにより測定した。スライドを種々のインクーパルで四型し、着色した。スライド当たり200の細胞、及び動物当たり3つの細胞をカウントすることにより、赤血細胞を既取したマクロファージの割合を観覚的に測定した。

抗体非依存性マクロファージは、抗SRBC血清またはIgM固分 (2000の最小タイマー) と混合されたSRBC (20%FCSを伴うRPMI-1640中 0.5%) を用いて測定した。混合物を37°Cで15分間インキュベートし、次に PBS (pH7.2) 中で二度洗い、再膨脹して元の体積とした。

血清分画:ユーグロプリン沈殿及び蒸留水に対する透析によって全血清を分画して IgMを除去した。40°Cで24時間の透析の後、沈殿物を1500×gの遠心分離20分により除去し、上澄みをイオン電気泳動に補体介在分解により分析した。5%未満の元のIgMが残存した。

B. 結果

マクロファージに対するアセマンナンの作用を評価するために、最初の実験はアセマンナンによるインピトロで培養されたマウス脾臓細胞を用いた (第2段)。

第 2 表

培養物中のマウス脾臓細胞の粗粒評価 による細胞タイプ (%)

	アセマンナン (g/くぼみ)			
培養時間	細胞 ^a	0.0	0.002	0.02
72時間	マクロファージ	30±8	32±7	41±3
	リンパ細胞	70±5	68±3	59±3
96時間	マクロファージ	22±4	28±4	40±0
	リンパ細胞	78±8	72±7	84±10

^a マクロファージ (モノサイト) はエスターーゼ着色により定義された。

結果は平均値±S.D.として表現される。結果は実験当たり200の研究された細胞での六つの実験からのものであ

る。“リンパ細胞”はエスターーゼにより着色しなかった細胞であり、ライトの着色 (Wright's stain) による細胞の外観を有した。

培養物は72または96時間インキュベートされ、実験の終わりに、染色剤をライト着色及びエスターーゼ法により着色し、マクロファージとリンパ細胞の相対的パーセンテージを測定した。72時間でアセマンナンなしで30%から、くぼみ当たり 0.2gのアセマンナンで45%へのマクロファージ数の、投与量に関係する増加があった。データは細胞パーセントとして示されているので、リンパ細胞における付随する現象があった。96時間においてやはりアセマンナンの存在下でマクロファージとの、投与量に関係する増加があった。96時間において、くぼみ当たり 0.2gのアセマンナンを伴う培養物は、黄色の着色により示されるようには相当の破分解があった。さらに、96時間培養物は、マクロファージの比較的低いパーセントを有し、これは多分、培養における培養のより長い時間におけるものであろう。マクロファージ数におけるアセマンナン誘発の増加のスタンダードに関係づけるために、同様の実験をマイトイエンPHA-Pで行った。結果を表3に示す。

特表平3-501624 (18)

表 3

培養物中のマウス脾臓細胞の組織的評価による細胞タイプ (%)

培養時間	細胞 ^a	P H A - P (g / くばろ)			
		0.0	0.02	0.01	0.2
12時間	マクロファージ	39±8	32±6	30±6	31±5
	リンパ細胞	70±12	68±8	70±6	69±4
96時間	マクロファージ	18±8	21±5	28±6	25±5
	リンパ細胞	77±10	79±4	74±8	75±8

a マクロファージ (モノサイト) はエスラーゼ着色により定義された。

結果は平均値±S. D. として表現される。結果は実験当たり 200 の研究された細胞での六つの実験からのものである。“リンパ細胞”はエステラーゼにより着色しなかった細胞であり、ライトの着色 (Wright's stain) による細胞の外観を有した。

マクロファージのパーセンテージは 12 時間で変化しなかったが、P H A - P を用いる 96 時間のインキュベーション後に、マクロファージにおける投与量に関係する増加があった。比較すると、アセマンナンは P H A - P に比べ 2 倍効果的である。マクロファージのパーセントは P H A - P での 7 に比べてアセマンナンで最大 18 増加させた (表 2 及び 3)。

対照におけるそれよりも大きい。しかし、差は統計的に有意ではない。

食作用におけるアセマンナンの作用が抗体依存性であるかどうかを測定するために同様の実験を抗 S R B C を用いて行った (表 5)。

表 5

抗体介在食作用^a

食細胞源	加温処理	抗体タイマー ($\times 10^3$) ^b			
		0	2	4	8
脾臓	食塩水	15±8	43±10	39±5	19±11
	チオグリコレート	48±11	89±22	80±22	58±14
	アセマンナン	38±14	78±15 ^c	62±8	40±18
骨髄	食塩水	11±4	33±9	32±11	20±4
	チオグリコレート	28±9	73±13	54±16	98±12
	アセマンナン	21±10	80±9 ^c	51±17	28±11

a. 食作用は赤血球摂取を示す細胞の平均%±S. D. として示される。

b. 対照による抗体タイマーは 1 : 1024 であることが示された。予備処理及び細胞源は方法の欄で述べる。

c. 95%倍濃水準でのスチューデントの t - テストにより評価すると、食塩水対照から有意に異なる。

アセマンナンがマクロファージのパーセントを増大させるようなので、食細胞の活性もまた増加さずかどうか測定することにした。食塩水、チオグリコレートプロスまたはアセマンナンを与えられた C B A マウスからの脾臓浸出細胞を、摂取されるべきヒツジ赤血球と用いた (食細胞として) (表 4)。

表 4

脾臓浸出物によるヒツジ赤血球の非特異的食作用^a

処置	食作用のパーセント ^b					時間(分)	
	時間(分)	0	5	10	20	60	120
食塩水	3±3	11±6	15±10	25±9	45±12	52±15	
チオグリコレート	1±1	14±6	20±8	52±14 ^c	84±32 ^c	89±21 ^c	
アセマンナン	3±2	10±6	12±8	41±16	61±18	63±23	

a. 結果は動物当たり二つのスライドでスライド当たり 200 細胞を数えることにより測定した。結果は二つの実験に近く。

b. 食作用パーセントは赤血球摂取を示す相対割合を示す。結果は平均%±S. D. として示される。

c. 95%倍濃水準におけるスチューデントの t - テストにより評価すると、食塩水対照グループと著しく異なる。

120 分間に渡って、非特異的食作用パーセントは、食塩対照において 3% ~ 52% に増加した。一方、チオグリコレートプロスで処理された動物からの細胞における食作用パーセントは 89% に増加した。アセマンナンで処理した動物における食作用は、120 分において 63% に上昇した。アセマンナンで刺激した食作用は、20 ~ 120 分後において、

血清を熱により不活性化し (50°C で 30 分間) 用いた抗体タイマーは、血球凝集タイマーよりはるか上の 2×10^3 であった。この実験においてマクロファージは二つのソース、すなわち腹腔及び脾臓から得られた。また、マウスは食塩水チオグリコレートまたはアセマンナンの I.P. インジェクションより予備処理された。 2×10^3 のタイマーにおいて、チオグリコレートで誘発された腹腔マクロファージの食細胞活性は、食塩水により誘発された対照からの活性の 2 倍 (89% 対 43%) 大きかった。一方、アセマンナンで誘発されたマクロファージは、対照に比べ 30% より活性であった (75% 対 43%)。アセマンナン処理と食塩水対照群における食細胞の差は統計的に有意であった。

同様の結果がマウスの脾臓から得られたマクロファージにおいて見られた。食細胞活性は脾臓から得られたマクロファージよりも低く、これは多分脾臓細胞の取り扱いによるであろう (方法の欄参照)。やはり、 2×10^3 のタイマーにおいて、アセマンナンで誘発されたマクロファージは 95% 倍濃水準で食塩水対照の食細胞活性において有意に高い。食細胞活性は 8×10^3 のタイマーにおいて対照と同等である。

抗体介在食作用に対する補体 (C') の作用を測定するために、C' の培地に対する添加を用いた実験を行った (表 6)。

表 6
抗体介在食作用の比較

細胞源	食作用誘発剤	%食作用 ^a	
		+C'	-C'
腹腔	食塩水	24±11	18±9
	チオグリコレート	84±10	62±12
	アセマンナン	70±8 ^b	54±4
脾臓	食塩水	18±11	16±9
	チオグリコレート	54±9	41±11
	アセマンナン	48±10	35±6

a. 食作用は30分間のインキュベーションの後のヒツジ赤血球の摂取%±S.D.として測定される。モルモット細胞を加えた。
b. 95%信頼水準におけるスチューデントのt-テストにより評価すると、-C'に比べ有意に異なる。

分割が起こらないであろうことを確認するために IgM-枯乾マウス血清の血漿を用いた(方法の欄参照)。用いたタイマーは血沈凝集反応及びコーム(Coomb)の方法を用いて測定すると3000であった。腹腔及び脾臓からの細胞はC'なしのものよりもC'の添加を伴う食作用においてより活性であったが、但しアセマンナンにより誘発された腹腔細胞においてのみ統計的に有意であった。

最後に、アセマンナン食作用及び付着の効果を区別するために実験を行った(表7)。

敵することを示す。結果はまた、アセマンナンが抗体の介在する反応を通して非特異的に及び特異的にマクロファージによる食作用を高めることを示す。これは、アセマンナンが食作用に対して免疫特性を持つことを示している。

例 3

抗HIV剤としてのアセマンナンの実験室評価

A. CARRISYN(商標)抽出物のHIV生菌及び感染性に対する効果

洗浄したH9/HTLV-III_B細胞の等密度培養物を様々な濃度のCARRISYN(商標)抽出物(アセマンナン)の存在又は非存在のもとで2日間培養した。次いで条件培養液を取り出してC₃細胞の培養物をこれで感染させるのに用いた。この培養液中の逆転写酵素(RT)活性も測定した。C₃培養物における感染はHIV-P24抗原合成のための間接免疫蛍光により調べた。

結果は表8にあげる。

CARRISYN (g/ml)	RT活性 cps × 10 ⁻³ /ml	感染性 (%)	表 8		
			(M)	A ₄₀₀	(%)
1000	588	100	—	1.40	0
100	808	100	—	1.45	0
10	918	100	—	1.35	4
1	908	100	—	1.40	0
0	1028	100	—	1.45	0

表 7

食作用と付着の比較^a

細胞源 ^b	予備処理	食作用	付着
腹腔	食塩水	6±8	8±4
	チオグリコレート	12±9	23±8 ^c
	アセマンナン	11±9	18±10 ^c
脾臓	食塩水	8±7	14±11
	チオグリコレート	14±6	30±10 ^c
	アセマンナン	10±8	20±7 ^c

a. 細胞混合物は7分間インキュベートされた。

b. 結果は食作用または付着を示す食細胞%±S.D.として示される。結果は用いた三つの動物について動物当たり200の記録した細胞を用いた一つの実験からのものである。

c. 95%信頼レベルでのスチューデントのt-テストにより評価すると、食塩水対照とは有意に異なる。

この実験においてSRCBCに対する抗体が2000のタイマーで用いられた。しかし、四肢は7分後に停止された。腹腔及び脾臓からアセマンナンで誘発されたマクロファージは付着において食塩水对照よりもより効果的であり、また以前に見られたようにチオグリコレートで誘発されたグループより有効でない。

C. 検討

この結果は、アセマンナンが食作用を直接及び間接に制

B CARRISYN(商標)抽出物のたちなたまめマンノシダーゼ活性に対する効果

CARRISYN(商標)抽出物(アセマンナン)を直接のたちなたまめマンノシダーゼ阻害による抗マンノシダーゼ活性について評価した。たちなたまめマンノシダーゼ活性は基質としてPNP-マンノースを用いて分析した。スウェンソンを陽性のコントロールとして評価した。

結果は表9にあげる。

表 9

CARRISYN (g/ml)	スウェンソン	平均	阻害
(M)	(A ₄₀₀)	(%)	(%)
0	—	1.40	0
0.001	—	1.45	0
0.01	—	1.35	4
0.1	—	1.40	0
1	—	1.45	0
10	—	1.50	0
100	—	1.55	0
—	0.1	1.40	0
—	0.2	1.10	21
—	0.5	0.74	47
—	1.0	0.465	67

C. マイクロタイタ感染アッセイ

CARRISYN (商標) 抽出物 (アセマンナン) (7.813~1000g/ml) をMT-2細胞についてのマイクロタイタ感染アッセイによって抗HIV活性について評価したが、HIV隔離HTLV-ⅢB(H9)を用いた。細胞 (細胞防御) 又はウイルス (HIV不活化) を感染試験 (チャレンジ) に先立ってCARRISYN (商標) 抽出物の存在のもとに4時間予備培養した。細胞毒性試験にはウイルスをアッセイから除いた。

結果は表10にあげる。

	MW	M	初期濃度
DRUG 1: 相互導性	4000,000	ERR	
DRUG 2: 相互防護	4000,000	ERR	
DRUG 3: 不活化	4000,000	ERR	
Drug 種別体:	2000		
ファイル種別体:	CARRISYN (商標) 抽出物4d		
相思コントロール	ウイルスの吸収吸収率 CARRISYNの投		
ウイルスコントロール	(標準0.387倍の量として) 吸収(g/ml) M		
DRUG1DIL1	143.762 % +/- 33.245 %	1000,000	ERR
DRUG1DIL2	147.813 % +/- 8.469 %	500,000	ERR
DRUG1DIL3	133.565 % +/- 20.915 %	250,000	ERR
DRUG1DIL4	140.315 % +/- 8.945 %	125,000	ERR
DRUG1DIL5	142.728 % +/- 8.080 %	62,500	ERR
DRUG1DIL6	142.036 % +/- 8.511 %	31,250	ERR
DRUG1DIL7	154.277 % +/- 5.621 %	15,625	ERR
DRUG1DIL8	158.845 % +/- 8.407 %	7.813	ERR
DRUG2DIL1	43.353 % +/- 0.883 %	1000,000	ERR
DRUG2DIL2	15.859 % +/- 4.205 %	500,000	ERR
DRUG2DIL3	12.068 % +/- 1.760 %	250,000	ERR
DRUG2DIL4	12.928 % +/- 6.115 %	125,000	ERR
DRUG2DIL5	12.411 % +/- 4.086 %	62,500	ERR
DRUG2DIL6	14.049 % +/- 2.260 %	31,250	ERR
DRUG2DIL7	13.076 % +/- 5.017 %	15,625	ERR
DRUG2DIL8	10.044 % +/- 2.088 %	7.813	ERR
DRUG3DIL1	1.895 % +/- 2.169 %	1000,000	ERR
DRUG3DIL2	11.920 % +/- 3.587 %	500,000	ERR
DRUG3DIL3	9.995 % +/- 4.092 %	250,000	ERR
DRUG3DIL4	14.997 % +/- 3.879 %	125,000	ERR
DRUG3DIL5	13.018 % +/- 4.181 %	62,500	ERR
DRUG3DIL6	12.068 % +/- 4.407 %	31,250	ERR
DRUG3DIL7	21.719 % +/- 2.209 %	15,625	ERR
DRUG3DIL8	16.518 % +/- 3.362 %	7.813	ERR

CARRISYN (商標) 抽出物 (アセマンナン) はMT-2細胞とリンパ球に対して毒性はなかったが、細胞の増殖促進剤であった。ウイルスの染料吸収値はCARRISYN (商標) 抽出物 (アセマンナン) の全ての濃度においてCARRISYNを含まない対照群の140 wed 150%であった。1000g/mlにおいてのみなんらかの抗HIV活性が得られた (すなわち細胞の43%が防護された)。

D. HIV GP-120の分子量に対するCARRISYN (商標) 抽出物の影響

³H-マンノースの使用とSDS-PAGEゲルのオートグラフィーによる分析とを用いてCARRISYN (商標) 抽出物 (アセマンナン) をHIV GP-120の分子量に対するその影響によって抗マンノシダーゼ活性について評価した。

洗浄したH9/HTLV-ⅢB細胞を、CARRISYN (1mg/ml) 及び (2-H³) D-マンノース (30C1/ミリモル、50C/ml) の存在のもとに2日間培養した。この条件培養液から次に高速遠心分離及び廃過 (0.45m) によって細胞を除去した。ウイルスを遠心分離 (18000rps、JA-20ロータ、4時間、20°C) によって集め、1ミリモルのフェニルメチルスルホニルフルオライド (PMSF) を含む消泡塩酸塩水 (PBS) で一度洗浄し、そして0.2mlのPBS-PMSF中に懸濁させた。次にこの可溶化したウイルスを適当な分子量のマーカーを有する10%アシルアミド中で還元条件のもとに電気泳動し、そしてフル

オログラフィーのために処理した。対照群のウイルスはCARRISYN (商標) を存在させなかつことを除いて同じ方法で合成し、処理した。

アセマンナンはグリコシレーション (GP-120生産) を阻害しなかったけれども多數のより大きな分子量帯域及びより小さな分子量帯域の出現をもたらした。アセマンナンは第6回に示すようにグリコシレーション (GP-120 HIVの被覆グリコプロテイン) を劇的に変化させた。

ウイルス被覆蛋白 (GP-120) は存在していたけれども、それらの高級及び低級グリコプロテインは試験管中でT₄受容体を奪い合う生存不能な欠陥ウイルスをもたらすのを証明することができた。これはT₄受容体を非感染性ウイルスグリコプロテインによってブロックすることによりT₄感染の割合を低下させるであろう。

例 4

CARRISYN (商標) 非特異的腫瘍分解に対する影響

この例はCARRISYN (商標) 抽出物で刺激された食細胞により誘導される非特異的腫瘍死亡の可能性を調べる。

A. 構成

CARRISYN (商標) 抽出物ポリマー:

CARRISYN (商標) 抽出物 (アセマンナン) を乾燥形態で維持した。各実験に要した量を秤量し、そして800Wの出力で2分間マイクロウェーブ照射した。この物

特表平3-501624(21)

質を遮断した遠心分離チューブ (16ml) 中に移し、そして更に1分間マイクロウェーブ照射した。この物質をHanks Balanced Salt 液波 (H B S S) 中で必要な濃度に稀釈した。若干の実験においてはこの物質はオートクレーブ加熱滅菌したが、活性に明瞭な損失は無かった。

細胞：

Harlan/Sprague Dawleyから得たB A L B/cの雌のねずみの腹膜腔からマクロファージを採取した。この採取の6日前にそれら動物の若干の群には腹腔内注入でチオグリコレートブイヨン (25mg/kg) か又は、C A R R I S Y N (商標) 抽出物 (25mg/kg) が注射した。追加的な対照群として塩水・刺激した細胞も用いた。採取した細胞をH B S S 中で3回洗浄し、そして 5×10^6 個/mlの細胞濃度にR P M I - 1840中で稀釈した。

ターゲット細胞：

American Type Culture Collection (C # H / H e N Fibro Sarcoma L 929) からターゲット細胞を得てこれを培養により維持した。標準化は、R P M I - 1840中の 10^7 個の細胞を含む細胞懸濁液 1 mlと混合した 150m C I のクロム⁵¹ ($C r^{51}$) により行なった。細胞を1時間培養し、R P M I - 1840で3回洗浄し、そして 5×10^4 個/mlの最終細胞濃度に調整した。

分析：

エフェクタ細胞の一定量 (100個/L) を平底マイクロタイタプレートの中に入れた。 $C r^{51}$ -標識した細胞を実験

座 11

C A R R I S Y N (商標) 抽出物の細胞毒性に対する影響

細胞	cpm ± S. D. a)	細胞毒性
生体中チオグリコレート	2800 ± 800	0.8
刺激した		
試験管中チオグリコレート	2950 ± 200	7.0
刺激した		
刺激しなかった	2870 ± 400	6.8
生体中C A R R I S Y N	3100 ± 800	7.4
刺激した		
試験管中C A R R I S Y N	21000 ± 900	60.0
刺激した		
生体中及び試験管中C A R R I S Y N	20500 ± 1100	48.8

a) : ターゲット細胞の全cpm = 42000

$C r^{51}$ ターゲット細胞とともに培養したチオグリコレート刺激したマクロファージは $C r^{51}$ 放射線を平均2800cpm の値で放出したが、一方、C A R R I S Y N (商標) 抽出物で標識した細胞は平均3100cpm の放射能を放出した。これら両群の間には統計的な差異は存在しなかった。刺激されなかったマクロファージは2800cpm の程度の放射能を放出した。しかしながらC A R R I S Y N (商標) 抽

出物で試験管中で刺激されたマクロファージは21000cpm の $C r^{51}$ 放射能放出を示した。このことはC A R R I S Y N (商標) 抽出物が長く持続する細胞分解作用を誘起しないと言ふこと、及びその活性化が組織培養において比較的短時間で現われ得るということの二つの明らかな事実を示している。細胞毒性%はcpm の値の経過と平行している。

表12に時間的な細胞毒性分析についての引き続く実験を示す。

CARRISYN (商標) 抽出物の細胞毒性
に対する時間依存の影響

時間 a)	測定 b)	cpo b)	細胞毒性
0	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	800 780	2.0 1.8
3	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	1400 800	3.5 2.0
6	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	18000 1200	40.0 3.0
9	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	22000 2200	57.9 6.8
12	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	22500 2300	57.8 5.8
15	CARRISYN抽出物 チオグリコレート	23000 21100	68.9 5.8

a) : 薬剤投与後の時間 (hr)

b) : 対照群細胞cpo = 30000

CARRISYN (商標) 抽出物の細胞毒性作用は刺激の後6時間以内に開始し、そして9時間後までにその最大値まで上昇した。この活性化の機序はまだ検討されていない。

抽出物で処理した。また7.5mlの食塩水中に稀釈した25mgのCARRISYN (商標) 抽出物を静脈内投与した。
 第7日：疾患1（上側疾患）を10mlの食塩水中に稀釈した50mgのCARRISYN (商標) 抽出物で処理した(18ga.針)。疾患2は7.5mlの食塩水中に稀釈した25mgの抽出物で処理した。また10mlの食塩水中に50mg溶解したものを静脈内投与した。
 第14日：疾患1を10mlの食塩水中に50mg溶解した溶液で処理したが、一方疾患2は5mlの食塩水中に25mgを溶解したもので処理した。また25mlの食塩水中に75mgを溶解したものを静脈内投与した。
 第21日：疾患1を10mlの食塩水中の50mgの溶液で処置し、そして疾患2を10mlの食塩水中に25mgを溶解した溶液で処理した。また25mlの食塩水中に100mgを溶解した溶液を静脈内投与した。
 第29日：疾患1を21日目のそれと同様に処置したが、局部分泌のため疾患2は直接は処置しなかった。25mlの食塩水中に100mgを溶解したものを静脈内投与した。
 第42日：疾患1は直接は処理しなかった。疾患2は10mlの食塩水中に25mgを溶解したもので処理した。50mlの食塩水中に100mgを溶解したものを静脈内投与した。
 第57日：馬1を安樂死させ、そして疾患1の部位から幾つかの組織試料を採取し、疾患2からは直腸部リンパ節及び処置の間に発見してしまった右脛の結節疾患を取り出した。
馬2：

い。

この例において示されたデータはCARRISYN (商標) 抽出物が他の非特異的治療における重要な役割を有するかもしれないことを示している。

CARRISYN (商標) 抽出物の馬類肉腫に対する強力な有効性のスクリーニング

2頭の馬の3つの頸肉腫をCARRISYN (商標) 抽出物で静脈内及び疾患内注入により処理した。この実験の目的は、CARRISYN (商標) 抽出物が馬類肉腫に対する効果的な処理剤であるかどうかを判定し、また患者に有害反応があるかどうかを調べることである。馬1については1個の頸肉腫が完全に分解したが、第2の頸肉腫は大きさが減少しなかった。第3の脂肪性頸肉腫は処理の間に大きくなかった。馬2についてはただ1つの頸肉腫のみが完全に分解した。

これらの結果はCARRISYN (商標) 抽出物が馬類肉腫の処置に有用であるであろうことを示唆している。

3頭の疑似疾患を有する2頭の馬を購入した。それらの疾患を写真に取り、測定し、そして組織検査により頸肉腫であることを確認した。

馬1：

第1日：右後脚の上の2個の疾患のそれぞれを直接注射(20ga.針)によって10mlの食塩水中に稀釈した(疾患1)50mgのCARRISYN (商標) 抽出物及び5mlの食塩水中に稀釈した(疾患2)50mgのCARRISYN (商標)

第1日：右脚下部の疾患を、30mlの食塩水中に稀釈した50mgのCARRISYN (商標) 抽出物で処理した。その半分を皮下注射(S/Q)し、残りの半分を疾患内に注射した。

それぞれ第6、10、24、30、49、56、63、70及び第77日に馬2に60~120mlの食塩水で稀釈したCARRISYN (商標) 抽出物100mgを投与し、その標榜致剤の量は溶液を透明にするための必要に応じて変えた。

それぞれ第105、113及び120日にこの臍病を5mlの食塩水中に稀釈した25mlのCARRISYN (商標) 抽出物で疾患内注射及びS/Q注射によりその疾患の基部において処置した。追加的に75mgを静脈内投与した。

結果：

馬1：

第1日：疾患1は2.5cm(水平長さ)×2.5cm(垂直高さ)×1cm(厚さ)の大きさであった。この疾患の分解は次のように追跡することができた。

馬の疾患 1					
日	に	ち	測	定	値
1	2.5	cm	×	2.5	cm
7	2.5		×	1.75	cm
14	2.0		×	1	cm
21	2.0		×	1	cm
29	2.0		×	1	cm
42	×扁平で乾燥 全てが殆ど治癒状態				
54	完全治癒				

疾患 2 は第 1 日目に $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ の大きさであったがこれには大きな変化はなかった。疾患 2 の結果を下記に示す。

馬 1 の疾患 2					
日	に	ち	測	定	値
1	2	cm	\times	2	cm
7	2		\times	2	1
14	2		\times	2	1
21	2		\times	2	1
29	2		\times	2	1
	脾全体がまだ腫上がつ ており疼痛状態				
42	大きさが僅かに低下したがなお腫れて おり、痛そうには見えない。				
54	大きさは同じ、脾の腫れは 85% に低下				

1についてのみ僅かな呼吸深度の上昇が見られた。局部的に馬 1 は温和な性質の炎症性蜂巣炎を疾患 1 のところに、そして疾患 2 のところでは第 29 日目にこの疾患にスケジュール通り注射されなかつた程の急性的疾患型のそれを示した。疾患 2 は繊維質であつてそれへの注射がより困難であり、従つて S/Q においてより多くの調れがあった。これが疾患 2 について効果がなかった理由と考えられる馬 2 は蜂巣炎を示さなかった。

結節性類肉腫が処置の間に広がつたという事実は、静脈内投与が類肉腫を炎症内処理に対して感受性にするかもしれないけれども、CARRISYN (商標) 抽出物の主な効果が全身反応よりは局部的な組織の反応であるという推測に導く。

馬 2 における疾患が分解した正確な日付は、観察者が 80 日間の解気にかかったために第 119 日から第 177 日までの間隠れていたために確認できない。第 56 日までの腫瘍の大きさに大きな減少がなかったことから判断するならば、毎週の静脈内投与だけでは馬 2 の類肉腫に対しては僅かな効果しかなかったものようである。

実施例 5

CARRISYNTHによるヒトリンパ球のアロ (同種異系) 応答の増強

本実施例は、CARRISYNTH 抽出物 (アセマンナン) (acemannan) のアロ (同種異系) 抗原に対する免疫応答を増強する能力を試験するとともに、潜在的な増強が単

結果:

馬 2 :

第 1 日：この疾患は $5 \text{ cm} \times 8.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$ の大きさであつて 2.5 cm の内径の滑いた基部を有していた。完全分解までの変化を次に示す。

馬 2 の疾患 1

日	に	ち	測	定	値	
1			5	cm	\times 3.5 cm \times 2.5 cm	
6			変化なし			
18			変化なし、より肉芽腫的			
24			5	cm	\times 3 cm \times 2.5 cm	
30			肉芽腫性低下			
49			4	cm	\times 3 cm \times 2 cm	
56			4	cm	\times 3 cm \times 2 cm	
63			8.0 cm	\times 3 cm \times 2 cm		
70			8.7 cm	\times 2.5 cm \times 1.8 cm		
77			2.7 cm	\times 2 cm \times 1.8 cm		
105			2.5 cm	\times 2 cm \times 1.8 cm		
113			3.5 cm	\times 2.25 cm \times 1.5 cm		
120			2.5 cm	\times 2.4 cm \times 0.8 cm		
177			疾患完全分解			

静脈内投与の後に心拍数に変化なく、そして発汗、筋肉の弛緩來けいれん又は明らかな苦痛の兆候がなかった。馬

球衝動 (monocyte-driven) 現象かどうかを試験するために試みられた。CARRISYNTH 抽出物は、混合リンパ球培養 (MLC) における同系抗原に対するリンパ球の応答を増強しなかつたが、用量応答模式におけるアロ抗原性応答を重要に増強した ($2.6 \times 10^{-7} - 2.6 \times 10^{-9}$)。CARRISYNTH 抽出物の効果は、特異的応答であり、in vivo で達成できる CARRISYNTH 抽出物の in vitro の濃度と一致することが示された。別々の一連の混合実験は、CARRISYNTH 抽出物の单球とのインキュベーションが、单球衝動 (monocyte-driven) シグナルがレクチンに対する T 活性の応答を増強することを可能にすることを示した。CARRISYNTH 抽出物のアセマンナン (acemannan) は、アロエ・ベラ (Aloe) 植物の活性成分であり、アロ抗原に対するリンパ球の応答を増加させたという点で重要な免疫増強剤であると結論された。この機構は、アロ抗原の保護の下に、单球の IL-1 放出の増強を伴うことが示唆される。この機構は、CARRISYNTH 抽出物が実験動物及びヒトにおけるウィルス感染を抑制する能力を一部分説明するであろう。

本実施例は、混合リンパ球培養に供されたアロ抗原に対する单球 - T - リンパ球細胞間相互作用のモデルにおける免疫増強剤としての CARRISYNTH 抽出物の影響を直接に評価するために試みられた。このモデルは、CARRISYNTH の、免疫学的に適切なモデルにおいて異なる单球 - マクロファージ機能を刺激する能力を試験す

る。

A. 材料及び方法

1. 細胞の調製 単核白血球は、グラスのthe Institutional Review Board of the University of Texas Southwestern Medical Centerによって示された研究の後援で、正常で、知らされかつ承諾したヒト志願者の末梢血液から得られた。末梢血液は、ハンクス(Hanks)の平衡塩類浴液(HBSS)で1:3に希釈され、*Journal of Clinical Investigation*, 59: 338-344(1977)記載の方法に従ってフィコール・ハイパック(ficoll-hypaque)勾配の上部に重ねた。主要組織適合性が異なると知られている被検者(subjects)からの細胞(cells)は、陽性の混合リンパ球反応を確かめるために各試験日に得た。特異的な実験のために、より注意して防微付けられた、単核白血球ペルルに存在する、細胞の系統を単離した。アリンパ球は、*Journal of Clinical Investigation*, 59: 338-344(1977)記載の標準ナイロン過濾分離技術によって単離された。これによって、その開示内容は参照によりこの中に明確に取り入れられている。ナイロン浴出液細胞は、約99%純粋なT細胞を含んでいた。Bリンパ球及び單球・マクロファージは、優先的にカラムに接着する。接着した個体群は、ブランジャーを用いて強制的にカラムに媒質を押し通すことによって除去された。單球(マクロファージ)を濾過するために*Journal of Clinical Investigation*, 59: 338-344(1977)記載のガラス接着方法を利用して95%を超えて

用物(agent)を用いて更なる一方向性MLCを始めた。

4. 單球・T細胞相互作用 ルイス雌性ラット脾臓を無四ステール製メッシュを通してRPMI-1640培地へ抓き裂いた(100g)。単核白血球を上述のようにフィコール・ハイパック(ficoll-hypaque)密度勾配の界面から集めた。ガラスベトリ皿上の酒精により得られ、 10^5 /mlの最終濃度に調整された單球を、2mlの全容量中のCARRISYNTH抽出物又は培地(対照)の用量を変えて、37°Cで24時間インキュベートした。單球を取り、新鮮な培地で広く洗浄し、次いで同系アリンパ球と、T細胞10:單球1の割合で、植物レクチン・フィトヘマグルテニン(ミシガン州デトロイト、Difco) [(1:100)] を用いて、37°Cで48時間共培養(co-culture)した。細胞をMASH II(メリーランド州ウォーカースビル、Whittaker, R. A. Bioproducts)上に取り、フッ素(Fluor)内に置き、シンチレーション計数器(イリノイ州シカゴ、Beckman Laboratories)で数えた。Tリンパ球をCARRISYNTH抽出物とともにインキュベートし、次いで、洗浄し、新たに調製したアリンパ球と再び10:1で、PHA-Pとともに共培養(co-culture)することにより、対照実験を行なった。

B. 結果

1. アロ抗原性応答 CARRISYNTH抽出物は、自己抗原に対するT細胞の応答について統計学的に重要な効果はなかった。混合リンパ球培養(MLC)の初めに作用物

純粋な個体群を得た。

2. CARRISYNTH抽出物 CARRISYNTH抽出物は、RPMI-1640培地中の0.5% (v/v) 溶液を調製し、更に次の作業濃度: 2.0×10^{-7} M、 2.0×10^{-8} M及び 2.0×10^{-9} Mに希釈することによりこれらの研究において試験した。

3. 混合リンパ球培養(MLC)

一方向性MLCは、マイクロタイマー、平底細胞培養プレート内で始めた(マサチューセッツ州ケンブリッジ、Costar Co.)。上述のフィコール・ハイパック(ficoll-hypaque)密度勾配技術により単離された単核細胞は、セシウム源(カナダオンタリオ州、Gammacell, Atomic Energy of Canada)において30分間2000ラドに被ばく後、刺激要因細胞として用をなした。同様に単離されたレスポンダー(responder)細胞、及び刺激要因を 1.0×10^8 細胞/mlに調整した。各ウェルに、25LのCARRISYNTH又は培地(対照)、10%ウシ胎児血清で補足された25LのRPMI-1640及び75Lの各細胞個体群を加えた。細胞を5%CO₂:95%空気中、37°Cで6日間インキュベートした。培養は、25Lの³H-チミジン(1 Ci/ウェル)で4時間瞬間標識(pulse)され、次いで細胞を取り、数えた。導入認識(afferent recognition)及びMHCに対する応答についてのCARRISYNTH抽出物の特異性を試験するために、細胞を³H-チミジンで瞬間標識(pulse)するちょうど20分前に加えられた前記作

(agent)を加えると、同系間刺激を受けた細胞はトリチエーリーションされたチミジンを、記述した用量で試験試薬(test reagent)の存在又は不存在下で同様に取り込んだ(用法についての第7図参照)。経口的CARRISYNTH抽出物の不存在下で、これらのMLCは、4時間の瞬間標識(pulse)の終りに 2818 ± 1000 cpsのトリチエーリーションされたチミジンを取り込んでいた。加えられた作用物(agent)の用量は増加傾向にあったけれども(2.0×10^{-9} Mで 3281 ± 1855 、 2.0×10^{-8} Mで 3742 ± 1870 、及び 2.0×10^{-7} Mで 3828 ± 1978)、DNAへの同位体の取り込み率には統計学的に有意差はなかった。

MLCにおける自己応答(autoresponse)に対するCARRISYNTH抽出物の効果の欠如と対照的に、同様の免疫学的分析で、作用物(agent)はアロ応答に対して効果があった(第7図)。先ず第一に、CARRISYNTH抽出物は、混合リンパ球培養においてクラス2のアロ抗原の差異を認識し応答するリンパ球の能力を妨げなかった;これは、同系間応答を、最小濃度の限界の存在下における同種異系間応答と比較すれば明らかである。第二に、 2.0×10^{-7} Mの最大用量で処理された培養が薬剤を加えていない培養に比し約80%の増加を示すように、用法応答に関連する、CARRISYNTH抽出物によるアロ応答の増強があった。同種異系間刺激に対するCARRISYNTH抽出物の効果は、結果が同系間応答の機能としてアロ応答のcpsとしてプロットされている第8図に非常に明らかに示

されている。同種異系間応答の増強が薬剤なしの状態に関して試験された各用量のCARRISYNTH抽出物で意味があると示されていることから、用量応答関係は非常に明確に証明されている。

CARRISYNTH抽出物がリンパ球アロ応答に対する特異的効果又はトリチエーションされたチミジン取り込みに対する非特異的効果を示すかどうかを確かめるために、7日の混合リンパ球培養MLCの終り、培養へのトレーサーの添加20分前に試薬を加えた。第9図に示すことができるよう、CARRISYNTH抽出物はMLCの終りに瞬間標識(pulse)としてこのように加えると、効果がなかった。これらのデータは、MLCにおけるリンパ系応答の増強に対するCARRISYNTH抽出物の効果の特異性を裏付ける。

2. CARRISYNTH抽出物及び单球-T細胞協力作用

CARRISYNTH抽出物は、アロ抗原に応答する单球を直接刺激し、シグナル(signal(s))を与え、抗原及び/又は分裂促進因子に対するリンパ系応答を増強するという推定を試験するために、精製した单球の個体群を種々の用量の薬剤と24時間インキュベートした。インキュベーションの終りに、细胞を広く洗浄し、次いでTリンパ球と10:1の割合で共培養(co-culture)し、末梢血液にみられる自然割合(natural ratio)をシミュレーションした。共培養(co-culture)した细胞をフィトヘマグルテニンで刺激した。第10図に示すことができるよう、予め

CARRISYNTH抽出物とインキュベートした单球との共培養(co-culture)は、用量間連換式において分裂促進因子に対する応答を有意に増加させた。

C. 結論

本例は、アセマンナンが重大な臨床的結果をもたらす免疫刺激剤として機能する可能性を調べた。

キャリシンTH(CARRISYNTH)抽出物は、動物並びにヒトに重大な疾患を発起するDNAおよびレトロウイルス感染を抑制し得るものと考えられている。例えば、動物モデルにおいて、キャリシンTH抽出物はネコ鼻気管炎を軽減した。

キャリシンTH抽出物が *in vitro* および *in vivo* で単純痘IIウイルス、ハジカウイルスおよび熱帯HIVに対して有効であり得るというもう一つの証拠がある。免疫機序が食細胞および抗原の求心性認識に寄与する細胞両者としての单球の増強に関連するかも知れない証拠がある。研究によれば、一方で单球の食細胞性の直接的増強が示され、かつ他方でこの重要な細胞の対照数の増加が示された。キャリシンTH抽出物がシグナル物質インタロイキンIの活性化单球による同化を増進するという概念を支持する頗る証拠がある。

本例で述べた研究は、特にキャリシンTH抽出物が免疫増強剤であり得るその機序を調べるために行われた。このMLCは、免疫担当細胞がウイルスの認識および応答に必要な種々な抗原に対する応答に関与する、その様式の上

*vivo*モデルである。この反応において、重要な单球-T・リンパ球相互作用があり、該相互作用がアロ抗原に対する応答を生ずる。この薬剤の、免疫賦活剤として機能する可能性を調べるために選択されたものがこのモデルである。

キャリシンTH抽出物は、従ってMLCにおけるアロ抗原応答の重要なエンハンサーである。投与量応答相関があり、調べられた基礎の約80%を超える最大の投与量での増強がみられる。このことは、統計的に有意であるばかりか、生物学的にも有意なアロ抗原に対する応答の増大を示し、かつ抗原剤がウイルス攻撃に対する生体の助けとなり得る一つの手段として機能し得る。このキャリシンTH抽出物の作用はアロ抗原性刺激に特異的であることが示された。但し、この薬剤は、薬剤がMLCの結合として添加された場合には、自己(同系MLC)に対する基本的応答も、トレーサーDNAプリカーサ、即ちトリチウム標識チミジンの非特異的取込みも増強しなかった。

第2の一連の実験では、单球-T・リンパ球相互作用が少なくとも部分的に混合リンパ球培養物中での高められたアロ応答に応答し得るという仮説を調べた。この一連の実験では、キャリシンTH抽出物は单球と共にインキュベートされ、その後処理しつつ十分に洗浄した单球は新たに精製した同系T・リンパ球と混合された。該T・リンパ球は薬剤に曝露されておらず、かつ曝露されてはならない。これら実験は、ポリクローナルマイトイジエンフィトヘマグルテニンに対するT・リンパ球応答の増強を立証しており、そ

の大きさは、投与量応答相間のベースラインの約55%上方の、MLCについて以前みられた応答に等しいものであった。

本研究でテストされ、MLCで有効であった最低投与量はこの单球の実験では何の効果も示さなかった。このしきい投与量は調べられた2つのモデル、即ちマイトイジエンに対するポリクローナル応答およびMLCにおけるアロ抗原性応答の間で異っていることは驚くには及ばない。また、この单球実験はキャリシンTH抽出物の効果のより厳格なテストであることもわかった。というのは、これがT細胞に對し処理单細胞、即ち单球を与え、その結果薬剤のない場合に免疫刺激を示すからである。このアロ抗原性応答は完全に、もしくは大部分インタロイキンI(II-1)のキャリシンTH抽出物・増強单球産生によるものと思われる一方で、レッサー・ポリクローナルマイトイジエン・増強応答は免疫刺激アッセイの結果であり、夫々キャリシンTH抽出物に對して見るしきい応答をもつ。

これらの実験で使用したキャリシンTH抽出物の投与量は臨床的に適切なものである。選択された投与量範囲は、薬剤が細胞外水中に分配された場合に達成されると思われ、かつ経口投与された投与量の1/3の割合で吸収されるキャリシンTH抽出物の濃度(濃度は以前に犬について行った薬理研究に基く)を包含するように正確に選択された。ヒトにおいて達成される実際の濃度はこの範囲内にあることが示され、このことは更に臨床的実験のこれら研究の有

特表平3-501624(26)

実施例 6 : 126g キャリシンTHカプセル剤の調製

kg / 投与単位	(A)	(B)
	製品を作るに要する母材 ブレンド用の原料の量	(A)
(1) アセマンナン (キャリシン TH) 抽出物粉末; U.S.P. No. 4,736,935	125	1250 g
(2) ラクトース U.S.P.	240.5	2405 g
(3) エーロシル TH 380 (コロイド状 シリコーン酸化物 NF)	3.8	38 g
(4) ステアリン酸カルシウム NF	1.9	19 g
	380ng	3800 g

A. カプセル剤混合物の製造

調製場所にあらゆる外来不純物がないかどうか検査する。作業者は無菌条件を維持しなければならず、かつてアーネット、ゴム手袋およびダストマスク（開放状の製品を扱う場合）を身に付けることが好ましい。標準的なホバートミキサー（Hobart Mixer）（ホバート社、オハイオ州、モデルNo.D 300）（30クォート容積をもち、“B”型ピーターブレードを備えている）を混合速度に設定する。原料を検査し、秤量した後、ミキサには初めて以下のよう充填する。成分(3) のエーロシルTH380 NF [デグッサ(Degussa) 社、ニュージャージー州テーター・ボロ(Teterboro)] を #12ステンレススチール製手動式スクリーンを通して分級しつつ成分(2) のラクトースドラムに入れれる。このエーロシル

380 酸化珪素は該ドラム内でスコップで混合して、該ラクトース U.S.P. [マッケッソン(McKesson)社、カリファルニア州バークレイ] 中にエーロシルを分散させる。作業者はこのラクトース／エーロシル混合物の 1/2 をホバートTHミキサに加える。次に、作業者は成分(1) のキャリシンTH抽出物を #12ステンレススチールスクリーンで分級し、これをホバートミキサに投入する。次に、作業者はこの分離した材料に、残り半分の該ラクトース／エーロシル混合物を加える。次いで、この分離した材料を10分間混合する。次に、作業者は成分(4) のステアリン酸カルシウム NF [マリンクロット(Mallinckrodt) 社、ミズリー州セントルイス] を #12ステンレススチール手動式スクリーンに通し、これをホバートミキサに投入する。更に3分間搅拌した後に得られる混合物は混合粉末である。これを、次いで清浄な二重・多層ライニング容器に放出する。次いで、作業者は重量を記録し、この混合物を最終的なブレンドのために保存する。次いで、成分(1) のキャリシンTH粉末を加え、更にこの最終ブレンドを清浄な二重多層ライニング容器に移す。最終ブレンドを含む容器の重量を記録する。この材料をカプセル化現場に送る。

B. カプセル充填

このカプセル化現場は予めあらゆる外来不純物につき検査される。作業者は無菌条件下に維持されなければならず、かつ好ましくはヘアネット、ゴム手袋およびダストマスク（開放状態の製品を扱う場合）を身に付けるべきである。

ある。モデル8カプセルTH(CapsuleTH) カプセル充填機を 0.8 ローセット (low set) に設定する。この機械のオーナーを粉末供給ホッパに取付ける。回転台の速度を調節して、指定の正味カプセル充填量を設定する。この機械の粉末供給ホッパを粉末（最終ブレンド）の全体の 3/4 となるように維持した。真空度および空気圧を #0 ポジロック (Posilock) カプセルサイズ（不透明白色 Q X） [エランコ(Elanco)、インディアナ州インディアナポリス] に調節する。カプセルの正味全重量を検査する。カプセルシェル使用に応じてカプセル重量を記録する。

C. カプセル研磨（仕上げ）

この処方領域を不純物につき検査する。作業者は顔面状態を保つべきであり、かつ好ましくはヘアネット、ゴム手袋および防塵マスク（開放状態の製品を扱う場合）を身に付けるべきである。カプセル研磨機 [ベンウォルト社のシャーペルズ・ストークス部 (Sharpels-Stokes Div. of Pennsalt Corp.)、ベンシルバニア州ウェーミングスター] の 88インチステンレススチールコーティングパンに、十分な量の塩化ナトリウム U.S.P. グラニュラー (Granular) [モートンソルトディビジョン (Norton Salt Div., リチャードソンテキサス)] を装入する。作業者は装入した塩化ナトリウムの重量を記録する。このパンを回転しつつ、作業者は未研磨のカプセルをこのパンに装入し、該塙床内でカプセルを回転させる。作業者は必要に応じて研磨カプセルを搅拌する。次いで、研磨されたカプセルを手動スク

特表平3-501624(27)

成 分	量/単位	製品を作成に要する量	
		(A)	(B)
(1) アセマンナン (キャリシン TM 粉末とし て) U.S.P. No. 4,735,935 に従って調製	50	600 g	
(2) ステアリン酸 (NE等級) (ユニ オンキャンプ社(Union Camp Co., ニュージャージー州ウェイン)	5	60 g	
(3) シロイド TM 244 (デビソン ケミカル社(Davison Chemical Co., メリーランド州レイチモア)	0.5	5 g	
(4) ソルカ TM フロック (ボルク TM Pipe (類似) [ジェームズリバー社 (James River Corp.) ジョージア州 アトランタ]	150.0	1500 g	
(5) コーンスターク (ベストフーズ社 (Best Foods Co.), ニュージャー ジー州イングルウッド)	100	1000 g	
	287.5	2875	

リーンでパンから取り出し、#10ステンレススチールスクリーンに通して過剰の塗またはカプセル殻を除去する。次いで、このカプセルを肉眼で調べて、すべての空のカプセルシェル、キャップ、または本体を除く。次いで、このカプセルを紙でライニングしたステンレススチールトレイに移し、單一層状に広げる。このカプセルを、ギザギザの端部、裂けをもつものがあるか否かあるいは充填量不足につき肉眼で検査する。作業者は検査したカプセルを二重多層ライニング容器にあける。このカプセルをサンプリングのために鉛封し、かつ包装する。最終重量、容器数および正味の重量を記録する。

実施例 7 : 50mg キャリシンTM錠剤の調製

A. 市販用混合物の調製

実施例6の装置を清浄かつ50%イソプロパノール〔デルタソルベント & ケミカルズ社 (Delta Solvents and Chemicals Co.)、テキサス75255 ダラス〕で消毒し、次いで乾燥した。以下の材料を別々に秤量し、2立方フィートのPKブレンダ〔"ツインシェルドライブレンダ (Twin Shell Dry Blender)" ; ハースコ社のパーターソンケリー部内(Patterson Kelly, Div. of Harsco Corp.)、ベンシルパニアイーストストラスブルグ、シリーズNo.710352〕に裝入し、30分間混合した。この最終製品を以下の(A)に示す組成の錠剤とする。

作業者によってこのPKブレンダを回転させ、混合を30分間続けた。

B. 錠剤調製

この混合粉末を10ガロンのステンレススチール容器に移す。ステンレススチールスコップを用いて、該混合粉末を、錠剤成形機〔ストークス "モデルF" シングルパンチタブレットプレスTM (Stokes "Model F" Single Punch Tablet PressTM)、ペンワート社のシャーベルス・ストークス部門 (Sharpels-Stokes Div., of Pennwalt Corp.)、ベンシルパニア州ウォーミンスター〕の錠剤プレスのホッパーに填した。この機械を手動で回転させて、数サイクルかけてバッチレコードに従う所定の錠剤成形圧(1~4トン)に調節する。作業者はモータを始動させ、錠剤成形機を動作させる。必要な調整は錠剤が適当な重量および硬さに達して一定となるまで行われる。作業者は10分毎に10錠の重さを計り、記録する。硬さはストークス硬度試験器で4~5の範囲とすべきである。

実施例 8 : 注射用キャリシンTM溶液の調製

A. 溶液の調製

キャリシンTM抽出物 (アセマンナン) をU.S.P. No. 4,735,935 に従って調製する。夫々重量約 100 g の、固潤状態にあるキャリシンTM抽出物12個のサンプルを英國メーソン (Mason) ジャーに入れ、凍結乾燥した (2単位: その一つはユニトップTM (UnitopTM) -800SLで、他方はフリーズモバイルTM (Freeze MobileTM) 21; いずれもバー

ティス社 (Vertic Corp.)、ニュージャージーガーディナー)。得られたキャリシンTM原料粉末を秤量し、重さを記録する。最終的に凍結乾燥品約 87 g を得る。クルップTM "ファーストタッチ" コーヒーミルモデル (KrupTM "Fast Touch" Coffee Mill Model) 203 (ロバートクルップ (Robert Krup) N. A.、ニュージャージークロスタ) を 50%イソプロパノール (デルク、ダラス) で消毒し、乾燥させた。作業者は無菌状態に保たれるべきで、かつ好ましくはゴム手袋および実験衣を身に付けるべきである。すべての作業はバク-ダウンTM (Bac-DownTM) 消毒薬 [(1) n-アルキル- (60% C₁₄、30% C₁₈、5% C₁₂、5% C₁₀)、ジメチル・ベンジル・塩化アンモニウムと(2) n-アルキル (88% C₁₂、82% C₁₄) ジメチルエチルベンジル塩化アンモニウム両者を含む: カーチンマターソンサイエンティフィック (Curtin Matheson Scientific)、テキサス州ハウストンにより市販されている] で消毒され、かつ清潔な下部バッティングでライニングされたバイオロジカルセーフティキャビネット (Biological Safety Cabinet) 内で行われる。無菌コーニング (Corning) ジャーを粉碎キャリシンTMを填入する前に秤量する。約 5 g の凍結乾燥キャリシンTM原料粉末を粉碎するが、その間に大きな片を小片に無菌 B-P ブレードで細断した。このキャリシンTM粉末はパルス化した作用で 100 メッシュまで粉碎して、微細粉末にした。このキャリシンTM微粉末を無菌コーニングジャーに入れて再秤量した。溶液を得るために、5

特表平3-501624(28)

g の微粉砂キャリシンTH粉末を 0.5% のクロロブタノール [コダック社、ニューヨークロチュエスター] を含む 1 l の通常の 0.05% 塩水 [トラベノール社 (Travenol Co.)、イリノイディアフィールド] に移し、大きな無菌の跑熱源を含まないピン (1.5l) に入れた。このキャリシンTH塩水溶液をオービトロンTHローター (OrbitronTHRotator) (ボッケル社 (Bockel Co.)、S. H. HRO 8155-27、ベンシリバニアフィラデルフィア) 上に、冷蔵庫内で一夜保ち、キャリシンTH含有溶液を可溶化させた。次に、このキャリシンTH塩水溶液をローターからとり出し、冷蔵庫内で 1 時間直面ぐに立てておき、粒子を沈降させる。

B. ピン詰め

締囲ゴムストッパを備えた皮下IV注射用の滅菌 60ml 容の市販 IV ピン [ホイトン社 (Hewton Co.)、ニュージャージーミルビル] を脱イオン水で洗い、アルミホイルでふたをし、圧力 16 ポンド、121°C にて 15 分間オートクレーブ処理した。この滅菌ピンを 170°C で乾燥炉に一夜放置して、残留している可能性のあるもらゆる跑熱源を不活性化する。このピン用のキャップもピンと共に洗浄し、オートクレーブ処理する。該キャリシンTH塩水溶液を 10ml アリコートずつ 60ml の滅菌した跑熱源を含まないピンに分配する。この工程はバイオロジカルセーフティキャビネット (クラス 2、タイプ A、ジャームフリー社 (Germ Free Co.)、モデル 820、フロリダマイアミ) 内で行われる。宜ましい濃度は塩水 50ml または 1 日につき夫々キャリシンTH約 50mg または

1 mg である。このピンは滅菌ゴムストッパで密封する。密栓したピン中のキャリシンTH塩水溶液は凍結乾燥されている。サンプルを乾燥した後、ピンを金属バンドで密栓し、適当にラベルを貼布する。次に、このサンプルを、良好な製造業者に従って、品質管理および安全性管理部から許可されるまで保存する。使用する際、25ml の正規の塩溶液 U.S.P. をこの 60ml バイアルピンの内容物に加える。この混合物は患者に投与する前に十分に振搾すべきである。

実施例 9: キャリシンTHゲル剤およびクリームの調製

本例で用いるすべての器具は 50% イソプロパノール (デルタソルベント & ケミカルズ テキサス 75285 ダラス) で清浄化かつ消毒し、次いで脱イオン水で洗浄する。10 ガロン (37.8l) の脱イオン水を、U.S.P. No. 4.785.835 特 [プロセス エクイップメント社 (Process Equipment Corp., ミシガンベルディング、モデル No. 1000 ガロン OVC, シリーズ No. 40860-2)] の実施例 1 の 1000 ガロンミキサの捕集タンクに入れ。この脱イオン水に以下の薬品を操作しつづく。

成 分	量
(1) メチルバラベン [サットンラボラトリーズ (Sutton Labs., ニュージャージーチャタン)]	881.0 g
(2) カリウムソルベート [マイルズラボラトリーズ (Miles Labs., イングアナエル カート)]	879.0 g
(3) イミダゾリジニル尿素 [ジャーマル TH (Germal TH) 115] (サットンラボラトリーズ)	180.0 g
(4) ナトリウムメクレン酸 [ジニネラルケミカル (General Chemical, ニュージャージバーシバニー)]	70.0 g
搅拌しつつ、原料アロエベラゲル (好みしくは湿润キャリシン TH 抽出物) を粉碎機から集めて、全体積 100 ガロン (378l) まで捕集タンクに入れる。このタンクをはずして配合領域に移す。ホモジナイザ (ケレバコフードエクイップメント & レフリゲーション社 (Crepaco Food Equipment and Refrigeration Inc., イリノイシカゴ) の圧力を 1500 psig に設定し、捕集タンクに接続する。このホモジナイザを始動し、生成物を 1000 ガロンステンレススチールタンクに取付けた開放ステンレススチールバスケットに放出する。生成物がミキサのブレードを囲ったら搅拌を開始する。搅拌は低速で一日中続ける。次いで、作製された 100 ガロン部分を 1000 ガロンタンクに装入する。レスリーズ TH (Leslie's TH) ケイ砂土フィルタ (モデル D.E. - 18)	

を用いる。ケイ砂土フィルタで処理した材料を 5 v/v % の 65% の次亜塩素酸カルシウム (ヨークケミカル社 (York Chemical), テキサス) で 20 分間フラッシュ洗浄し、次いで脱イオン水で同様に処理する。1 kg のケイ砂土 (イーグルピッチャー社 (Eagle Pitcher Co., オクラホマツルサ) を 11 ガロンの脱イオン水に加え、懸濁するまで混合する。この最終混合物をレスリーズTH ケイ砂土フィルタを介して水が透明になるまで循環する。次に、過剰の水を、生成物を含むケイ砂土フィルタからフラッシュする。この生成物を漿 (pulp) がなくなるまでフィルタを循環させる。次いで、最終製品を 30 分間混合し、包装する。

実施例 10: キャリシンTH灌注液または洗腸液の調製

ミキサ、ホモジナイザおよび他の実施例 9 の装置を備えたタンクを、50% イソプロピルアルコール (デルタソルベント & ケミカルズ社、テキサス 75285 ダラス) で消毒し、熱脱イオン水で洗浄した。ケイ砂土フィルタを 5% 次亜塩素酸カルシウム溶液 (ヨークケミカル社、テキサス) を全系に 20 分間通すことにより消毒する。

10 ガロン (37.8l) の脱イオン水を実施例 9 の 1000 ガロンミキサの捕集タンクに加える。搅拌しながら以下の薬品をこの脱イオン水に溶す。

成 分	量 (g)
(1) ナトリウムベンゾエート U.S.P. [サウスランド (Southland)、テキサス、ダラス]	750

特表平3-501624(29)

成 分	量 (g)
(2) グリシン (エムーテック (Emutec) 、 テキサス、グラス)	3.0 (kg)
(3) クエン酸U.S.P. (マイルズ、インジアナ、 エルカート)	410
(4) カリウムソルベートU.S.P. (同上)	569
(5) ピタミンE (1000単位) [ホフマン・ ラロッシュ (Hoffman-La Roche) 社、 テキサス、グラス]	1カプセル

搅拌を続け、キャリシンTH湿润抽出物を粉碎機に装入して捕集タンクに送り、全体積を 100ガロン (379L) とする。このタンクを取りはずして実施例9のように配合領域に送る。実施例9の消毒したクレバコホモジナイザの圧を1500 psigに設定し、該1000ガロンミキサの筋集タンクに接続する。このホモジナイザを始動し、該1000ガロンのジャケットを備えたステンレススチールタンクに取付けられた開口ステンレススチールバスケットに生成物を放出する。このホモジナイズ処理の始動並びに停止時間は記録される。生成物がミキサブレードを壊したら搅拌を開始する。約 151.2 g のナトリウムメタ亜硫酸 (ジェネラルケミカル社、ニュージャージー、バーシバニー) をこの混合物に加え、20分間搅拌を続ける。作られた全体の100 ガロン部分を1000ガロンタンクに装入する。この生成物を一夜放置する。次いで、ケイ砂土フィルタを熱脱イオン水でフラッシュし、次に 1 kg のケイ砂土 (イーグルビッチャー社、オ

クラホマ、ツルサ) を10ガロンの脱イオン水に加え、懸濁するまで混合する。この混合物を水が透明となるまで該ケイ砂土フィルタを通して循環する。過剰の水を、生成物が残を含まなくなるまで該ケイ砂土フィルタを通して該生成物からフラッシュする。この生成物を、品質管理および安全性確認部で許可されるまで保存する。生成物が許容されたら、ピン詰めを行う。

実施例 11 : キャリシンTH坐剤の調製

A. 器具の消毒

まず、すべての器具を50%イソプロパノール (デルタ、テキサス、グラス) で消毒し、熱脱イオン水で洗う。約 0.27 kg のエウトラTH (EutraTH) バラフィンミネラル油 & ベトロレータム (コリーン・リアン社、テキサス、グラス) を乾燥ケトルに投入し、搅拌する。次に、約 30kg のバラフィン (カーボワックスTH (CarbovaxTH) : n.p. = 37°C、ユニオンカーバイド社、コネクティコットンパリー) を加える。

B. 坐剤の調製

該エウトラTH材料およびカーボワックスTHバラフィンを、まず搅拌しつつ 50°C ± 5°C で加熱し、次いで加熱を止め、搅拌を続ける。1.0kg のプロピルバラベン (サットンラボラトリーズ、チャタム N.J.) と 2.0kg のブチルバラベン (デルタ、テキサス、グラス) とを加える。次いで、この溶液を、15~20分、該保存剤が溶けるまで混合する。80.6kg のレシチンとタンパクバインダ (アルコリーTH

(AlcolecTH) ; アメリカンレシチン社；ジョージア、アトランタ) を加え、20分間混合する。温度をチェックし、この混合物を必要ならば再加熱する。この混合物の温度を、約 40°C で一定に保ち、ゆっくり搅拌しつつ 10.1kg のミコナゾール (miconazole) ニトレート (U.S.P.) を加える。次いで、加熱を停止し、搅拌を続けながら、102.0g のキャリシンTH湿润抽出物を加える。

C. 坐剤の成形

この混合物を、公知の坐剤成形機 (これは A. 合成、シンチャウまたはプラスチック型でよい) に注入する前に十分に混合する。この混合物をゆっくり注入して気泡の吸込みを避けるべきである。この坐剤と鋤型とを冷却により十分に冷す。冷却した坐剤を急冷した後、過剰の生成物をかき落とす。鋤型を開き、坐剤を取出す。十分な時間をかけて冷却して取出しを容易にし、かつ完成した坐剤の型けを最小化することを推奨する。この製品は、標準的な良好な製造工程に従って品質管理安全部門から承認されるまで保存する。

実施例 12 : キャリシンTH点眼薬の調製

成 分	量
(1) 混合D. I. 水 (73ガロン)	27.6kg
(2) 湿潤キャリシン TH 抽出物	284kg
(3) ホウ酸	5.7kg
(4) 塩化ナトリウム	1.1kg
(5) EDTA + 2ナトリウムNF	567g

(6) メトセル (Hethocel) E 4 M プレミアム NF	284g
(7) 塩化ベンザルコニウムNF	58.7g
(8) ナトリウムメタ亜硫酸NF	112.2g

A. 必要な器具の消毒

予め公知の方法で清浄化したタンク、ミキサおよび付属品 (上記実施例9参照) は 50%イソプロパノール (IPA) 溶液 (デルタ、テキサス州、グラス) で消毒し、次いで、熱D. I. (脱イオン) 水で洗ってアルコールをなくす。次に 5%次亜塩素酸カルシウム (ヨークケミカル、テキサス、グラス) 溶液をポンプおよび取付けたホース (これらは後に 50% IPA 溶液でフラッシュされ、かつ最後に該機器がアルコールを含まなくなるまで熱D. I. 水でフラッシュされる) を介して挿入する。適当なホモジナイザ (および付属ホース) およびポンプを、次に 50% IPA 溶液で消毒し、更に IPA がなくなるまで熱D. I. 水でフラッシュする。5%次亜塩素酸溶液を搾取し、ケイ砂土フィルタ系全体に20分恒温させる。予め公知の手段で清浄化した 0.2 μ フィルタおよびハウジングを次いで 50% IPA 溶液で消毒する。

B. 調製

73ガロン (278L) のD. I. 水とナトリウム亜硫酸 (ジェネラルケミカル社バーシバニー、N.J.) を 100ガロンのステンレススチールタンクに投入する。次いで、搅拌を開始し、キャリシンTH湿润抽出物を1000ガロンミキサから集めて実施例9の捕集タンクに入れ、全体積を 150ガ

特表平3-501624(30)

ロン(587L)とする。このタンクを、上記のように、取りはずして配合場所に移し、予め消毒したホモジナイザを圧力1500psigに設定する。これを挿抜機タンクに接続する。このホモジナイザを始動し、生成物を開口ステンレススチールバスケットに放出する。該バスケットは適当なサイズのジャケットをもつステンレススチールタンクに取付けられている。このホモジナイズの開始および停止時間を記録すべきである。すべての作成した100ガロン部分を1000ガロンステンレススチールタンクに貯入する。

この消毒液を熱D. I. 水を用いてケイ藻土フィルタからフラッキングで除き、1kgのケイ藻土(イーグルビッチャー社、オクラホマ、ツルサ)を10ガロンのD. I. 水に加え、懸濁液が得られるまで混合する。この混合物を、水が透明になるまで該ケイ藻土フィルタを通して循環する。過剰の水をこのフィルタからキャリシンTH抽出物でフラッキングで除き、次いで該フィルタを通して循環する。混合しつつ、このキャリシンTH製品を0℃で加熱する。以下の試薬を加え、溶液が完全に均一になるまで混合を続ける。ホウ酸(ハンコック、テキサス、フォートワース)、塩化ナトリウム(モルトンソルトディビジョン、テキサス、リチードソン)、EDTA・2ナドリウム(ダウケミカル、テキサスホーストン)および塩化ベンザルコニウム(ラジャーケミカル、ヒルサイド、N.J.)。この生成物を一夜冷却する。

翌日、この溶液を搅拌しつつ80℃に加熱し、次いで27℃

(8) ラウリル硫酸ナトリウムNF 190.0g

A. 消 置

予め清浄化した実施例9のタンク、ミキサおよび付属品を50%のイソプロピルアルコール(IPA)溶液(デルタソルベント&ケミカルズ社、テキサス、ダラス)で消毒し、D. I. 水でIPAがなくなるまで洗浄する。5%の55%次亜塩素酸カルシウム(ヨークケミカル、テキサス、ダラス)の溶液を、ポンプおよび付属ホースから排放し、次に搅拌装置をD. I. 水でフラッシュする。このポンプ、ホモジナイザおよび付属ホースを50%IPA溶液で消毒しD. I. 水で搅拌装置がIPAを含まなくなるまでフラッシュする。

予め清浄化した実施例9のレスリーズTHケイ藻土フィルタを分解し、すべての部品を85%の次亜塩素酸カルシウムの5%溶液中に入れる(15分)。すべての部品をブールしたフィルタに入れ替える。10ガロンのD. I. 水と400gの55%次亜塩素酸カルシウムとから溶液を作る。この溶液を20分に亘り全系に循環する。次いで、この全系をD. I. 水で30分、あるいは塩素がなくなるまで洗浄する。

B. 製 造

40ガロンのD. I. 水(152L)を挿抜機タンクに入れ、以下の部品を搅拌しつつ該D. I. 水に溶す。メチルバラベン(サットンラボラトリーズ、シャタン、N.J.)、イミグゾリジニル尿素(同)、クォーターニウム・15(ダウケミカル、ヒューストン、T.X.)、カリウムソルベート(マ

イ) に冷す。混合しつつ、メセルTHE 4 Mプレミアム(ダウケミカル、テキサス、ホーストン)を該混合タンクに加えて溶解させる。この溶解液の様、この生成物はロミコン(Rosicon) 0.2μフィルタ(アミコンU.S.A.社、ダンバース、Ma)を介して通過される。pHを調べて記録する。所定のpHは8.0±0.5であり、必要ならば氷融化ナトリウム(サーチャントウルヒ、テキサス、グラス)を用いてpH調節してもよい。最終pHを記録する。浸透圧を調べ記録する。所定の浸透圧は290±20である。必要ならば塩化ナトリウムでこの浸透圧を調節してもよい。最終浸透圧を記録する。良好な製造手順に従ってサンプルが承認されたら、この生成物をポンプでドラムに移し、このドラムからミクロテスト用にサンプリングされる。この生成物は適切な品質管理部門で承認されるまで保存される。

実施例 13: キャリシンTH創傷湿潤液の調製

成 分	量
(1) D. I. 水(40ガロン)	152.0L
(2) メチルバラベン	948.0g
(3) イミグゾリジニル尿素NF(ジャーマル(Germal)115)	948.0g
(4) クォーターニウム(Quaternius)・15NF(ダウイシル(Dowicil)200)	758.0g
(5) カリウムソルベートNF	758.0g
(6) ナトリウムメタ重亜硫酸NF	78.0g
(7) キャリシンTH抽出物ゲル(50ガロン)	224.0L

イルズ、インジアナ、エルカート)およびナトリウムメタ重亜硫酸(ジェネラルケミカル社、バーシバニー、N.J.)。通常的に搅拌しつつ、キャリシンTH抽出物を粉碎機から集めて挿抜機タンクに送り、全体系を100ガロン(378L)とする。このタンクを前と同様に配合場所に移し、予め消毒したホモジナイザの圧力を1500psigに設定し、挿抜機タンクに接続する。このホモジナイザを始動し、生成物を1000ガロンステンレススチールタンクに放出する。前と同様に生成物がミキサブレードを覆ったら搅拌を開始する。ラウリル硫酸ナトリウム(デュポン、ウィルミントン、DE)を加え、一方ミキサは低速で搅拌を繼續する。すべての作られた100ガロン部分を前実施例と同様に1000ガロンタンクに貯入し、この生成物を一夜放置する。

消毒液を、D. I. 水でケイ藻土フィルタからフラッキングで除き、1kgのケイ藻土(イーグルビッチャー社、オクラホマ、ツルサ)をD. I. 水10ガロンに加え、懸濁するまで混合する。この混合物を水が透明になるまで該ケイ藻土フィルタを通して循環する。過剰の水を生成物で該ケイ藻土フィルタからフラッキングで除き、生成物を透明になるまで該フィルタに循環させる。この溶液は、良好な製造実務に従い、品質管理並びに安全性確認部門で承認されるまで保存する。

実施例 14: キャリシンTH含有湿気遮断クリームの調製

特表平3-501624 (31)

成 分	量
(1) 凍結乾燥キャリシン TH 粉末 (U.S.P. No. 4,735,935号)	102.0 g
(2) D. I. 水	30.0 g
(3) 塩化ナトリウム U S P (モルトソルト ディビジョン、リチャードソン、TX)	102.0 g
(4) クォーターニウム - 15(Dowicill 200) (ダウケミカル、ヒューストン、TX)	31.0 g
(5) エウトラ TH (コリーンライアン社、 グラス、TX)	957.0 g
(6) レシチン (アルコリー TH Z - 3 ; アメリカンレシチン社、アトランタ、GA)	30.0 g
(7) プロピルパラベン (サットンラボラトリーズ、チャタン、NJ)	1.0 kg
(8) プチルパラベン (デルタ、グラス、TX)	1.0 kg

A. 消毒

予め清浄化した実施例9のケトル、ミキサ、ポンプ、ホースおよび容器を消毒する。

B. 製造

エウトラTH混合物 [ミネラルオイル、ペトロレームおよびパラフィンから作製 (コリーンライアン社、グラス、TX)] を乾燥ケトルに入れ、攪拌を開始する。この混合物を攪拌しつつ50°C±5°Cに加熱する。加熱を停止し、攪拌を継続する。プロピルパラベンとプチルパラベンとを次に加え、溶解するまで攪拌する (約15~30分)。レシチン

を加え、混合を20分間続ける。次に、キャリシンTH抽出物溶液を該混合物に加える。ゆっくり攪拌しつつ強制冷却を開始し、生成物が固体となるまで冷却を続ける (約25°C)。このサンプルを試験に供し、該生成物は、良好な製造業者に準じた品質管理および安全性検査部門の承認があるまで保存する。

実施例 15

生物活性

カリシン (商標) 抽出物が根巻芽細胞の増殖を促進するということが、インビオおよびインビトロの両方の実験により観察された。制御を超えた2~3のファクターによる促進が時々記録された。表13は72時間にわたって、0.1% (質量/容積) の濃度でのカリシン抽出物により影響された根巻芽細胞増殖カウントを表わす。これらの実験は、種々の条件下で製造されたカリシン抽出物の試料への細胞の応答を評価するためになされた。

表 13

根巻芽細胞培養におけるカリシン抽出物の影響

カリシン試料	濃度 % (v/v)	24時間 48時間 72時間		
		96	96	96
T C X ラボ (Lab.) 7/25/85	0.1	90.7	102.2	103.8
バッチ 1	0.1	104.3	180.7	120.5
バッチ 2	0.1	72.1	123.2	144.9
バッチ 3	0.1	75.5	180.9	128.4
バッチ 4	0.1	102.8	131.2	135.1
バッチ 5	0.1	79.3	115.0	120.2
バッチ 6	0.1	57.7	180.9	118.3
バッチ 7	0.1	86.1	110.0	120.2
バッチ (ラボ.) 5/85	0.1	81.1	188.8	100.7
マン (Man.) バッチ 1 B	0.1	125.6	174.8	114.8
マンバッチ 2 B	0.1	108.5	175.3	118.6
マンバッチ 3 B	0.1	138.9	158.4	147.0
マンバッチ 3 B (水和物)	0.1	103.3	141.3	158.9
グルコマンナン (コンジャク植物*)	0.1	103.8	80.0	108.6
对照 S C M	0.1	100.0	100.0	100.0

* Konjac plant

実施例 16

傷の処理のための通常の局所剤 (topical agent) の比較

培養したヒト根巻芽細胞への細胞毒性

傷を浄化するために普通使用されるいくつかの局所剤の細胞毒性を決定するためにヒト根巻芽細胞の培養物を使用した。その目的は、カリシン抽出物を含有する傷のゲルを、異なった形式の作用を有するいくつかの標準の浄化剤を用いて比較することであった。これらの標準の浄化剤は、表皮性の障壁の突破後の細胞の障害および組織破壊を減ずることを意図されている。放射性元素標識クロムの放出およびトリパンブルー色索の取り込みが細胞毒性を測定するために使用された。培養根巻芽細胞は 0.5% の濃度のカリシン抽出物により障害を受けなかった。対照的に、ポビドン・イオジン (povidone-iodine) [ベタジン (Betadine)]、トリプシンおよびペル (Peru) [グラヌレックス (Granulox)] のバルサム、クロロヘキシジン (ヒピクレン (Hibiscin)) および過酸化水素は、標識細胞から Cr^{61} を放出した。ベタジン、ヒピクレンおよびグラヌレックスはまた、トリパンブルーでの着色度を高めたが、カリシン抽出物での処理ではそうではなかった。これらのインビトロでの研究に基づいて、カリシン抽出物は局所性の施与および傷の処置のために安全であると思われる。

細胞培養

ヒト皮膚の根巻芽細胞は新生児の包皮の外植片から、および帝王切開で下肢部から集めた大人皮膚の試料から成長

特表平3-501624 (32)

された。組織は、脂肪および皮下の結合組織を含めいにし、2mm³粒子に切り刻み、そして小さな(250d)培養フラスコに置いた。培地は、5%ウシ胎仔血清(fetal calf serum)(ヘーゼルトン(Hazelton))を追加した最小必要培地(Hindus Essential Medium(MEM))(インランドラボラトリーズ(Inland Laboratories))、200U/mlのグルタミンおよび1%の抗生素質からなり、この培地を添加した。培養物は5%CO₂ 密閉気下、37°Cに維持した。

数日以内に、ケラチン生成細胞および樹脂芽細胞の混合物が組織の端から成長した。ケラチン生成細胞は、分裂に失敗したが、10~21日以内に樹脂芽細胞が増殖して、特徴的なうずまき模様を有する伸長した細胞の單一層を形成した。すべての培養物は使用前に少なくとも3回培養を行ない、10~15回の培養までについて使用した。

局所剤

インビトロ系での細胞障害を測定するために、傷や床ずれ(decubiti)の処置に普通に使用されるいくつかの製品を、ヒト樹脂芽細胞の標準化した培養物に直接添加した。ポビドン・インドン溶液(ベタジン)、過酸化水素、グラヌレックスおよびクロロヘキシジン(ヒビクレンズ)が異なる作用メカニズムを有する普通に使用される淨化剤である。これらの化合物(0.001~0.5%)を、培養樹脂芽細胞における細胞毒性効果について、カリシン抽出物と比較した。

細胞の処理

で除することにより計算した。

細胞毒性の2つ以上の評価(alternate assessment)をトリパンブルーで着色することにより行った。細胞は、それぞれの試験薬剤と共に15分間インキュベートした。トリパンブルー(1%)を各ウェルに加え、さらに5分間インキュベーションを続けた。試料は光学顕微鏡で検査し、ニコン逆相(Invited phase)顕微鏡に付けたニコン35mmのカメラで写真を撮った。細胞毒性は、対照(非処理)細胞と比較して、トリパンブルーで着色した細胞の百分比を決定することにより評価した。

表 14

トリパンブルー着色により 決定した局所剤の細胞毒性

製 品	濃 度	インキュベーショ ン 時 間	着 色 %
ベタジン	0.01%	15分	100
ヒビクレンズ	0.01%	15分	100
グラヌレックス	0.01%	15分	100
カリシン抽出物	0.01%	15分	5
培 地 の み	-	15分	1

培養細胞を処理剤のそれらまたは培地のみと15分間インキュベートした。トリパンブルー(1%)を施与し、5分

融合性の单一層から得た細胞をパックス(Pucks)・EDTA溶液に短時間(5~10分間)さらした後0.25%のトリプシンで分離した。懸濁させた細胞を遠心分離してペレット化し、新鮮な培地で1度洗浄し、そしてグルタミン、抗生素質および1%ウシ胎仔血清を追加したMEM中に再懸濁させた。電子細胞計器(Coulter Electronics)、ヒーリー(Hilleah)、F.I.で細胞数を測定し、個々の実験のために必要とされるように希釈して調整した。細胞はCr⁵¹(1 Ci/ml)で標識し、24ウェルのマルチウェルプレートに1ウェル当たり10⁵個の密度で培養した。このプレートは、インキュベーターに18時間戻した。各実験の最初に、放射性培地を吸引により除去し、各ウェルを1%ウシ胎仔血清培地を加えた新鮮なMEMで4回洗浄した。MEM単独または試験製品の種々の希釈物を含むMEMを、複数の(replicate)ウェルに添加した。そしてプレートを1~30分間インキュベートした。インキュベーション時間の最後に、培地を集め、放出された放射活性の測定のために取っておいた。各ウェルの細胞を、0.1M NaOHを加えたトリトントリオキソドリオキシド(1%)0.5mlを添加して溶解し、溶解物の試料を放射活性の測定に用いた。

細胞活性の測定

種々の化学薬剤と共にインキュベートした樹脂芽細胞から放射性クロムの放出により、細胞活性を定義した。

パーセント放出は、放射活性量を培地および細胞の両方

後に数を数えた。結果は、着色された視野内の全細胞数のパーセントとして表した。

細胞活性のタイムコース

局所剤による直接細胞傷害が急速に生じ、細胞からのCr⁵¹の放出の増加により反映された。培地のみで、または10%ウシ胎仔血清で処理した培養樹脂芽細胞は、5~80分間のインキュベーション中全クロム標識物の5%より多くは放出しなかった(図11)。それに対して、0.05%グラヌレックスまたはヒビクレンズで処理した細胞は、5分以内に全標識物の55%~82%を放出した。10分間又は15分間のインキュベーションは、3種の薬剤全部についての放出量を増加させたが、より長いインキュベーション(30分間)では、放射活性の放山を目にするほど高めることはなかった。カリシン抽出物(CDWG)(0.06%)で処理した細胞は90分間のインキュベーション中に全標識物の5%より多くは放出しなかった。

細胞傷害における濃度の影響

濃度0.005~0.05%の範囲で、種々の薬剤についての細胞活性を試験した。第12回に示したように、グラヌレックスおよびヒビクレン(0.01%)はそれぞれ、樹脂芽細胞から、全クロム標識物のおよそ25%および75%放出した。ベタジンの最低濃度(0.005および0.01%)による放出は、培地単独による放出よりも多くはなかったが、0.015%ベタジンにさらされた細胞は、全放射活性の70%より多くを放出した。カリシン抽出物の濃度を0.5%まで上げても、培

地単独のものより多くは放出しなかった。

トリパンブルー着色を細胞傷害を評価するために用いた場合に同様の結果が得られた。表14に示したように、0.01%ベタジン、ヒビクレンズ又はグラヌレックスを用いての15分間のインキュベーションは細胞を100%殺した。同じ濃度のカリシン抽出物を用いたインキュベーションは5%しか殺さなかった。0.01%の濃度の過酸化水素は形態学上の変化により判定されたように細胞に無い損傷を与えたが、この薬剤によるトリパンブルー着色はその脱色効果のために測定できなかった。

組合せた薬剤の効果

いくつかの実験において、抽出物が保険効果を有するかどうか決めるために、他の典型的な薬剤の添加前に、カリシン抽出物を椎芽細胞に添加した。培地単独および10%ウシ胎仔血清含有培地で細胞毒性効果が測定された。図13では、カリシン抽出物単独では細胞を損傷しなかったが、15分間のインキュベーション中にベタジン、グラヌレックス又はヒビクレンズにより放出された $C + ^{51}$ の量を変更しなかった。同様に、インキュベーション培地中のウン胎仔血清の含有は、これらの薬剤の細胞毒効果を変えなかった。動物における焼けた組織へのカリシン抽出物の凍結乾燥していない、安定化されていない初期のバージョン(earlier version)の効果の独立した評価のために、ミゲル・ロドリゲツ・ビガス(Miguel Rodriguez-Bigas)らの「テンジクネズミのやけどの傷の処置におけるアロエベラの比較効果」

(81 プラスチック アンド リコンストラクティブ サージェリー[Plastic and Reconstructive Surgery] 81: 386(1980))を見よ。

実施例 17

83才の女性患者、T.B.、左足の外側の端に直径25mmの潰瘍が発生した。この潰瘍は数ヶ月間存在しており、いくつかの処置発生法に応答しなかった。

この傷を1日3回処置するというスケジュールで米国特許第4,735,935号明細書の実施例3の生成物および米国特許第4,735,935号明細書の実施例7の生成物で処置した。きれいな傷を米国特許第4,735,935号明細書の実施例2の生成物で15分間浸した。過多の生成物は、乾燥した無菌の4×4ガーゼで傷から吸収した。米国特許第4,735,935号明細書の実施例7の生成物を次に、傷をおおい、かつ傷が包帯交換の間に脱水するのを防ぐのに十分な量で、施与した。

傷の治ゆの経過は、間隔をおいた写真および傷の欠損の面積測定により測定した。傷の終結の経過を表15に示す。

彼女はゆっくりと他の頭物を取り去り、そして病状は改善し続いた。この患者は唯一の頭物としてのカリシン抽出物に支えられた。そして、彼女の物理的試験および症状は、全体的に普通であると記録された。

潰瘍性大腸炎およびクローン病に対する同様の応答を有するさらに4つのケースがみられた。1人の患者は、カリシンカプセルを使った。4週間で、軽やかな症状を訴えはじめ(軽やかな腹部の不快感を伴う便通が増加した)、彼女は頭物の投与のために戻った。3日間で彼女は全体として普通の腸の統合的症状に戻った。

実施例 18

多くのエイズ患者は、毒性作用や副作用を受けることなく、キャリシン・エキスを大量に投与される治療を長期間に亘って受けている。T-4及びT-8リンパ球比率の上昇や、T-4の絶対数の増加がエイズ患者に見られたが、通常の感染症が軽減されたばかりでなく、頭痛的症状が軽減又は除去された。

エイズ患者のリンパ球が刺激されている現象が見られるので、キャリシン・エキスは免疫抑制に関与しているものと考えられる。

実施例 20

疼痛チック又は第5頭部神経の神経痛の特徴は、三叉神経の1つ以上の枝神経に亘る激しい耐え難い痛みの発作である。この痛みは通常、一過性のものであり、発作は頑のある部分、いわゆるトリガー・ゾーンに触れることにより

表 15
傷の治ゆの経過

日	傷の領域 (S.g., I.n.)	治ゆのパーセンテージ
1	1.24	0.00
28	0.51	58.87
77	0.29	78.81
83	0.12	90.82
97	0.00	100.00

この表皮性の欠損は、12週間で質的に終結した；完全な終結は14週間で生じた。

実施例 18

82才の患者は「長年」の間、潰瘍性大腸炎の病歴を示した。活性の発現の間は、プレドニゾン(prednisone)40mg、アズルフィジン(Azulfidine)3g、6-メルカブトブリソノン50mgおよびフラジル(Flingyl)の日々の投与法に応答しなかった。彼女は日ごとに腹痛と4~8回の血性便活動(bloody bowel movements)をうつたえ続けた。彼女は過敏度に罹患された。内視鏡所見は、潰瘍を壊死るために、軽やかな肝細胞を用いて、上行性の粘膜にひどい潰瘍を示した。この患者は、他の薬に加えて、1日に4回カリシン抽出物50mgを与え、家へ帰した。1週間で彼女の症状は事実上消失した。彼女の親は彼女が柔軟で柔らかく(tender)、そして内視鏡は治ゆしたそして柔軟で柔らかく充血した粘膜を示した。

特表平3-501624(34)

取まる。

この疼痛性の病気の原因及び治療法は知られていない。この疾患を治療する試みがいくつか成されているが、ほとんど又は全く成功するには到っていない。鎮痛剤やフェニトインの使用、痛みのある神経の末梢神経部分の除去、またガッセル・ガンギリオンへの80%アルコールの注入のような種々の治療法が試みられている。

より徹底的な治療法として、ガンギリオンに最も近い神経の感覺根の切開が行なわれるが、切開された神経が占める患者の体の部分はこれにより永久に無感覚になる。最近試みられた方法として、カルマバゼピン(carbamazepine)やフェノリオフェンシレート(phenoxyphenylhydantoin)の注射があげられる。しかしながら、これらの注射は痛みを伴うしひれや、大きな副作用をもたらすという問題がある。

上記の治療法はいずれも好ましいものではない。

43歳の女性が疼痛チック症であると診断された。患部は右側の三叉神経の第1及び第2部分であった患者は右側の部分の頭部にブラシをかけたり、くしを当てることによって痛みを誘発することができた。ジアゼパム(Diazepam)、抗ヒスタミン、鎮痛剤、プロプラノロール塩酸塩(Inderal)及びフェノバルビタールによる治療は効を発さなかった。患者の話によれば、この病気にかかってから痛みの無い日は1日もなかったということである。

そこで用當された方法が、米国特許第4,735,935号明細書の実施例2に記載された生成物を毎日1~2オンス3ヶ

月間服用することであった。3ヶ月後この治療法の評価を行った。

この療法を開始してから2週間以内に患者の痛みは大きく軽減された。患者によれば、その後数週間は気分が良かったという話であるが、それから2週間の旅行に出かけたところ(その間薬を服用しなかった)、症状と痛みが再び戻ってきた。患者は再び薬を服用はじめたところ、数日の内に痛みは消えた。次の数週間は再び良好な状態であった。

液剤を毎日6ヶ月以上に亘って服用したところ、既にブラシをかけても痛みが誘発されることがなくなったという報告を患者から受けた。患者の表情も良くなり、患者自身も以前より大分気分が良くなったという話である。

実施例 21

患者応答の試験的診断基準の開発を含む、41人の症候HIV患者において経口アロエドリンクを用いて得られた結果

第一の2年間の臨床バイロットをテキサスおよび連邦INDに基づき14人のARCエイズ患者について行い、アロエドリンクまたはアロエの凍結乾燥品(カリシン(登録商標)抽出物)がHIV・I患者に臨床効果をもたらすかどうかを調べた。このバイロットが開始された時、HIV感染の診断を確立し患者応答を監視する試験は存在していないか、あるいは、有用ではなく、原始的なものであった。この研究において、カリシン抽出物の500~1000mg/日の

摂取が、臨床応答のための境界投与量を構成することがわかった。処置不可能な状態ではないバイロットARC・エイズ群の8人の患者が、90日の治療において、改変したウォルターリード臨床スコアにおいて71%の改善を達成した。病状が進み重症な合併症を有する6人のバイロットエイズ患者は、彼らの臨床スコアにおいて20%の増進を記録した。このように、病状の進んでいない患者ではさらに急速な改善がみられ、より良い健康状態に進んだ。独立した学術的情査学者がこのデータを分析し、患者の改善が99.5%の信頼区間で治療によるものであると結論を下した。このバイロット研究の結果は、このバイロットが結論づけられているときに有用になりつつあったより客観的な評価方法を受けていた患者からのデータの収集及び分析を正当化した。第一のこの研究において15人の患者が分析され、これらは「パルス・マクダニエル群」と称される。第2群の26人の患者も分析され、「ワトソン・マクダニエル群」と称される。

A. 治療中の患者の評価の一般的アプローチ(第1及び第2群)

これらのバイロットにおけるアロエドリンクによる処置の結果の記録にたいする一般的アプローチは以下のとおりであった。

1. 患者群は、カリントン・ラボラトリーズ社が製造した経口アロエドリンクで1日あたり20液量オンスで処置されたHIV症候患者で構成された。

2. これらは、この特定のアロエドリンクを医師により処方され、従ってブラシーやあるいはブラインド成分を使用しない患者の記録を分析する通じ研究であった。

3. 研究患者は、HIV治療に有用と考えられる秘密の測定及び追加の薬物を避けるように奨励された。かれらは、採取したすべての薬物を医師に報告すべきことが強制された。しかし、各患者は薬物の採取がアロエドリンク処置からの排除の基準とはならないとの助言を受けた。

4. 臨床評価は、改変したウォルターリード臨床スコアシートを用いて、独立した医師により行われた。

5. すべての臨床データは、秘密に処理され、標準チャートパケットに保存された。

6. 患者の身元と結果の秘密が守られた。コード番号がチャートとすべての記録につけられた。

エイズ患者用に処方されたすべてのアロエドリンクの処方、1985-1988

成 分	95v/v
脱イオン水	40.00
安息香酸ナトリウム、U.S.P.	0.10
グリシン、F.C.C.	0.80
クエン酸、U.S.P.	0.11
ソルビン酸カリウム、U.S.P.	0.05
メタビニ酸ナトリウム、F.C.C.	0.02
生アロエベラゲル	58.58

特表平3-501624(35)

香 料

「アダムスペスト」ブランドパニラエキス	0.032
天然シナモン油、FCC	0.002
「リアル」ブランドライムジュース	0.128
「アダムスペスト」ブランドレモンエキス	0.108
	100.000

抗酸化剤としてビタミンEを添加した。

B. 評価基準

治療に対する好みの患者応答は、改変したウォルターリード臨床スコアの減少、各評価期間の先の試験より10%以上の絶対T-リンパ球の増加及びコア抗原レベルが陰性に保たれているか10%以上減少したことが、臨床的に及び実験室的に認められることとして定義された。

患者は以下の基準により選別された。

1. 2種以上の反応性ウイルス抗原により、ウェスタンブロット法でHIV抗体陽性
2. 少なくとも1つのエイズの典型的症状
3. 標的母集団は、 $150 \text{--} 350 \text{ mm}^3$ の絶対T-4ヘルバーリンパ球数を持つ患者であった。しかし、この範囲より高いあるいは低い数値の患者も対象とした。
4. この研究群では、年齢、人種または性の差別をしなかった。
5. すべての患者は、外来患者とされ、他の調査のための実験研究群に属さないことが要求された。この評価によっ

180日後、これらの同じ患者の平均数は402に上昇し、350日後にデータをとった12人の患者では、T-4ヘルバーリンパ球数は、489であった(第14図)。ワトソン・マクダニエル群では、28人の患者の平均の絶対T-4ヘルバーリンパ球数は、経口アロエドリンクによる90日間の処置により217から259に上昇した(第15図)。これらのデータから、アロエドリンクはT-4ヘルバーリンパ球数に好みの効果を有すると結論される。

標榜ウォルターリードスケールを改変して、HIV抗体の状態及びライフスタイルまたは危険な母集団を排除した。これは、この処置がこれらのパラメーターに影響を及ぼすことが期待されなかつたからである。さらに、医師がHIV症候に遭遇するとみなした場合には、患者個人の苦情と身体の所見を評価シートに加えた。

改変したスケールを用いると、パルス・マクダニエル群の患者の記録は、初めの平均スコア5.0が、90日で3.4に、180日で2.2に、350日で1.5に低下した(第16図)。ワトソン・マクダニエル群では、再調査した28人の患者において初期の平均改変ウォルターリードスコア2.98が1.78に低下した(第17図)。この図において、平均スコアは、2つのサブグループについて示されている。18人の患者のグループは処置に対する好みの応答をもつことが予想され、10人の患者のもう一つのグループは、応答が鈍いことが予想された。両グループの平均スコアは減少した。しかし、好みの応答が予想された18人のスコアは2.0から1.1に

て評議された条件がより表弱したHIV患者の選別に使用された。

6. 提案された処置は、グラスワースメディカルセンターの人体実験調査レビューボードにより受け入れられ承認された。この計画は、個人医師調査新規免除の批准であった。患者は、通知された同意セッションにおいてこれらの事実を評価された。

登録パラメーター

1. 履歴及び身体検査、並びに改変したウォルターリード臨床スコアにおける特別の強調点
2. HIV抗体及びウェスタンプロット
3. 血小板を持つ完全な血球数
4. 21-試験生化学プロフィール
5. 血清コア抗原試験(P-24)アボットダイアグノスティクス
6. T-4及びT-8リンパ球の比を含む定量的蛍光フロー血球計算
7. 1986-87バイロットにおけるFICOL分離白血球の培養
8. 1986-87バイロットに対する遅延皮膚試験抗原

C. 結 果

パルス・マクダニエル群の患者におけるHIV患者の記録から算出したデータは、15人の患者の平均の絶対T-4ヘルバーリンパ球数が、経口アロエドリンクによる90日間の処置により355から380に上昇したことを見ている。

変化したのに対し、他方のグループのスコアは8.5から2.0に減少した。これは線の勾配によって示されているように、後者のグループについて改善の度合いが遅いことを示している(第17図)。

パルス・マクダニエル群の記録では、15人のHIV患者のうち6人が初めにおいて検出可能な血清コア抗原をもっていた。90日後、4人の患者が陽性であった。180日後、14人の患者のうち3人が陽性であり、350日後、11人のうち3人が陽性であった(第18図)。ワトソン・マクダニエル群において同様の結果が観察された。血清コア抗原の減少がデータから示唆された。しかし、その差は有意とは思われなかった(第19図)。

予備処置絶対T-4リンパ球レベル(ABT-4)及びP-24コア抗原レベルが、どの患者がアロエドリンクの20液量オンスの毎日投与に好みしく応答するかを明らかにすると思われたので、パルス・マクダニエル群の15人のHIV患者を2グループに分け、アロエドリンクに対する応答群及び非応答群とした。

パルス・マクダニエル群の結果から導かれた仮説は次のとおりであった。「初期絶対T-4リンパ球レベルが 150 mm^3 より大きく且つ初期HIVコア抗原(P-24)が粘性または 800 pg/dL より小さい場合、患者はアロエドリンクに対して好みしく応答するであろう。逆に、初期絶対T-4リンパ球レベルが 150 mm^3 より小さく且つ初期HIVコア抗原レベルが 800 pg/dL より大きい場合、患者はアロエ

ドリンクに対してあまり応答しないであろう。」

ワトソン・マクダニエル群では、これらの推定予想基準が見込みをもって適用された。16人の患者が好ましい予想基準($A B T \cdot 4 > 150 \text{ mm}^3$ 、 $P \cdot 24 < 300 \text{ pg}/\text{dL}$)に合致した。90日以内に、10人の患者(61%)が予想どおり改善され、3人が混合及び／またはわざかな応答を示した(表16)。低い予想($A B T \cdot 4 < 150 \text{ mm}^3$ 、 $P \cdot 24 > 300 \text{ pg}/\text{dL}$)の10人の患者のうち、7人は予想どおりあまり応答しなかった。しかし、2人はすべての改善基準を満たし、1人は混合応答を示した。結局、26人の患者のうち20人(77%)が予想どおり90日の処置後応答した。26人の患者のうち15人(56%)がすべての評価期間においてすべての改善基準を満たした($A B T \cdot 4$ が10%以上増加し $P \cdot 24$ が陰性または減少し且つ変更したウォルターリード臨床スコアが減少する)。表16は、4回(0, 90, 180及び350日)のそれぞれにおいてデータをとった11人の患者の $T \cdot 4 / T \cdot 8$ ヘルパー／サブレッサー／リンパ球比を示している。

第2グループ(ワトソン・マクダニエル群)のアロエドリンクによる90日処置後の、20人の患者の状態に対する予想基準の適用のまとめ

応答区分	基準状態	患者数	百分率
<u>処置に対して好ましい応答</u>			
<u>が予想された16人の患者</u>			
全基準改善	13	81%	
混合及び僅かな応答	3	19%	
鈍い応答	0	0%	
<u>処置に対して鈍い応答</u>			
<u>が予想された10人の患者</u>			
全基準改善	2	20%	
混合及び僅かな応答	1	10%	
鈍い応答	7	70%	
<u>まとめ</u>			
<u>90日間の治療を受けた26人の患者</u>			
15人	全改善基準を満足	58%	
4人	混合及び僅かな応答	15%	
7人	一様に鈍い応答	27%	
20人	予想どおり応答	77%	

表 17

パルス・マクダニエル群のそれぞれの期間においてデータをとった11人の患者の $T \cdot 4 / T \cdot 8$ ヘルパー／サブレッサー／リンパ球比

患者	処置日数				
	1D #	0	90	180	350
20		1.13	0.68	1.66	1.03
28		0.82	0.60	0.76	0.88
31		0.20	0.61	0.68	1.10
33		0.88	0.46	0.52	0.63
35		1.00	0.88	1.04	1.07
41		0.82	0.75	1.29	1.10
42		0.60	0.30	0.67	1.05
43		0.58	0.58	0.88	1.08
50		0.08	1.00	1.09	0.92
52		0.83	1.17	0.78	1.18
55		1.28	0.81	0.49	1.04
平均		0.80	0.74	0.89	1.02
1.0以上の患者数		3	2	4	8

パルス・マクダニエル群とワトソン・マクダニエル群の両者(15+28人)において、41人の患者中24人すなわち59%が90日の治療で上記改善基準を越えまたはこれを満足し

た。うまく行くと期待された患者の臨床及び実験室での改善のこの傾向は、350日まで続いた。骨髄、肝臓、腎臓、またはその他の器官の損傷または抑制を示す血液学的または生化学的証拠は認められなかった。アロエドリンクを摂取した41人のHIV感染患者は、非活性を示せず、アロエドリンクに起因するとみられる有意の、矛盾のない、または特有の副作用を示さなかった。

実施例 22

炎症性腸疾患にアセマンナンを用いた予防的臨床バイロット研究

炎症性腸疾患(IBD)は、クローン病及び潰瘍性大腸炎をまとめた用語である。クローン病は主として回腸及び結腸に発生し、潰瘍性大腸炎は結腸に限定される。IBDの原因を説明するために、少なくとも3つの仮説ができる仮説が提唱されている。その第1は、未知の感染性物、例えば、ゆっくり成長するバクテリアやウイルスが免疫系の引寄せを引き起すというものである。第2は、食品のポーン(borne)や環境中の汚染物のような毒性物質により同じようなことがおこるとするものである。第3の仮説は、炎症性応答が自己免疫状態だとするものである。しかし、この病気の正確な原因は不明である。

A. 患者の選別

患者は、年齢、性、民族または人種的背景を考慮することなく選別した。すべての患者がボランティアであった。各患者は医師により簡単な説明がなされた同意書を受け取

特表平3-501624(37)

り、それに併用するよう要求された。

I B D の以下に示す症状及び兆候の組合せを有する患者だけが認められた。

1. 排便の回数（下痢）
2. 便中の血液（潜血）
3. 造影粘液生成
4. 自然発生的腹痛
5. 約診時腹痛
6. 絶えず続々腹挙
7. その他（体重減少等）

上記症状を用いて0から7までの臨床評価スコアを与えた。すなわち、1は1つの症状を示し、7はすべての症状を示す。スコア0は患者が無症状であることを示す。

B. 内視鏡評価

内視鏡を用いて以下の基準により患者に前及び後治療のスコアをつけた。

- | |
|-----|
| 潰瘍 |
| 融合性 |
| 斑点状 |
| 線状 |
| 分節 |
| 充血 |
| 滲出物 |
| その他 |

上記内視鏡観察を用いて0から5までのスコアを与えた。

すなわち、1は1つの症状を示し、5はすべての症状を示す。スコア0は患者が内視鏡検査で無症状であることを示す。

C. 組織学的評価

組織学的所見のスコアは次のように記載した。

- | |
|-----------|
| 滲出物 |
| 済腐化した粘膜 |
| 浮腫 |
| プラズマ細胞 |
| リンパ球 |
| 多形核白血球 |
| エオシン好性白血球 |
| 肉芽腫 |
| 粘液腫瘍 |
| 椎維症 |
| その他 |

上記臨床、内視鏡及び組織学的基準を用いてIBDの症状を評価しアセマンナン処置に対する応答を定義した。内視鏡と組織学的サンプリングを伴った身体検査は、規則的な予定された通院に限定した。患者には、いつでも理由なく且つ通常の治療に及ぼす影響を考慮することなく、この処置についての約束の描画が認められた。アセマンナンは、カリントンラボラトリーズ社から提供された。

D. 血液検査

9人のIBD患者が受け入れられ、毎日カプセルに入っ

た200mgのアセマンナンで処置された。患者の年齢は14才から46才まであり、女性4人、男性5人であった。一般的に、患者は腹痛、下痢または多數回の排便を伴っていた。便は普通血液が混じり、粘液の生成の増加とともに水のようになり、あるいは两者を伴っていた。初期内視鏡検査は、粘膜の陥れを伴った血管の充血から焦点の広範囲にわたる融合性潰瘍（全大腸炎と呼ばれる）に至る粘膜変化のスペクトルを示した。大腸のバイオプシーの組織学的検査は、慢性炎症細胞の非特異的増加から多數の多形核白血球とエオシン好性白血球を伴った明らかな漸層に至る損傷を示した。2人の患者は、微細肉芽腫と粘液腫瘍をもっていた。すべての患者は、アズルフィジン、ブレドニゾン、6-メルカブトブリノン及びフラギルの一種または二種以上を含む通常の薬剤に対して非応答性であった。イモジウムとトランキライザーが、上記薬剤に添加されることがしばしばあった。

薬物投与に対する応答は一様に好ましく、すべての患者においてすべてのスコアが改善された（第20～23図）。平均の前及び後薬物投与スコアは以下のとおりであった。

平均前処置臨床スコア	4.56 (9人の患者の平均)
平均後処置臨床スコア	0.44 (9人の患者の平均)
平均前処置内視鏡スコア	3.88 (8人の患者の平均)
平均後処置内視鏡スコア	0.00 (2人の患者の平均)
平均前処置組織学的スコア	8.25 (8人の患者の平均)

平均後処置組織学的スコア N/A (全患者がバイオプレーを拒否した)

アセマンナンに起因する副作用は研究期間中全く観察されなかった。宿気の発現をよく経験している数人の患者は、最終的に2～5日瘤及び症状が消えたと報告した。その他のもの、特に焦点分離疾患（クローン病及び回腸炎）の患者では、アセマンナンの効果はより遅くそれほど劇的ではなかった。すべての患者が後処置バイオプレーを拒否し、僅かに2人の患者が後処置内視鏡検査を受け入れた。次の理由が患者によりあげられた。(1)これらの操作が不快であること、及び(2)改善された条件のため費用が正当化されないと。

2人の患者は気まぐれで症状が止たときのみアセマンナンを摂取した。2人は薬物を摂取後24～48時間で症状が軽減したと報告しているが、アセマンナン処置をやめると4～6週間で現やかな症状が戻った。統いて、アセマンナン処置を2～3日行うと再び症状が軽減した。アセマンナンは、この疾患の急性炎症性の場面で劇的な臨床改善を与える。

実施例 23

インビトロにおける单球/マクロファージによる
 C^{14} ラベルしたアセマンナンの取り込み

ヒト末梢血液単球細胞培養物と C^{14} ラベルしたアセマンナンを用いてバイロット研究を行い、アセマンナンの生体系への導入あるいは吸収を追求した。この実験の目的は、

特表平3-501624(38)

C¹⁴ラベルしたアセマンナンの普通の末梢単球／マクロファージ細胞による取り込みが、(a) 检出可能であるか、(b) 時間に對して定常的か散発的か、(c) 0.5%濃度で毒性があるか、及び、(d) 最終的に、単球／マクロファージ細胞が、培養環境（培地）中に存在するアセマンナンより高い濃度までそれ自身の細胞中にアセマンナンを濃縮できるかどうかを調べることにある。

A. C¹⁴アセマンナンの調製

C¹⁴ラベルした二酸化炭素で育成したアロエ植物のゲル由来の、C¹⁴ラベルしたアセマンナン 100mgを、50mlのポリプロピレン遠心管中に秤量した。抗生物質ゲンタマイシン 100ug/mlを含む滅菌水5mlを加えた。5日後、この管に、RPMI 1840 + Ab + 1%Hepes + 10%加熱不活性化ウシ胎児血清 + 1%L-グルタミンの5mlを加えた。時々振拌して、可溶化を冷蔵庫温度（5°C）で1週間保持して行った。14日目に、10ug/mlアセマンナン溶液の2.5mlを3つの滅菌10ml管のそれぞれに分配した。2.5mlの単球／マクロファージ培地を加えて5ml中の最終濃度が10ug/mlとなるようにした。これら5mlの調製物を次に、末梢血液起源の単球／マクロファージ細胞を約500,000 含む3個の25cm²の組織培養フラスコのそれぞれに移した。

B. 末梢血液単球／マクロファージ細胞の調製

グラス・ワースメディカルセンターの血液学部から、EDTA中に娘めた血液を入手した。正常な血液学的パラメーターを有する血液のみを用いた。セラテック・コー

24, 48, 72時間後、3個のアッセイフラスコのそれぞれを次のように処理した。アセマンナン溶液をインキュベーションフラスコから取り出し、15mlの滅菌円錐型ポリスチレン遠心管（上清管）に移した。フラスコを1mlの単球／マクロファージ培地により回転振拌しながら洗浄し残存するアセマンナン溶液を吸めた。洗浄液を上清管に加えた。1mlのトリパンブルー（PBS中0.01%）をこのフラスコに加え5分間放置しフラスコを相コントラスト顕微鏡で検査した。1%未満の粘着細胞が細胞であった（生存していない）。トリパンブルーを除去した。このフラスコを1mlバックスEDTAで洗浄し、洗浄液は捨てた。バックスEDTAを粘着細胞のフラスコに加え、30°Cで約3分放置した。バックスEDTAを除去し、15mlの滅菌円錐型ポリスチレン遠心管（細胞マス管）に移した。12.5%のトリプシンを含む3mlのバックスを一度に1ml加え、粘着細胞を解放した。最後に加えたのちゴムのボリスマンを用いて残存する粘着細胞を搔きとつて解放した。バックス／トリプシン中の細胞の最終濃度は細胞マス管中約4mlであった。相コントラスト顕微鏡でフラスコを検査したところ、フラスコ中には細胞は殆ど残存していないかった。細胞フラスコに使用しなかったすべてのC¹⁴ラベルしたアセマンナン溶液を対照として保存した。

すべての管とフラスコを酸加水分解中冷蔵した。すべての管を強熱セリウム凍結乾燥機で凍結乾燥した。凍結乾燥物に2NのTFA（トリフルオロ酢酸）5mlを加えた。

ボレーショーンのセラセル-NM（登録商標）システムを用いた2段分離法により、比較的純度の高い（88.96±0.27）単球細胞画分を得た。このサスペンションを、3個のコーンギング #25100 25cm²組織培養フラスコのそれぞれにフラスコあたり約750,000の細胞密度となるように入れた。アッセイ中の細胞の仮定した最終数の細胞マスを実現するため、2個の25cm²フラスコからの細胞（それぞれ50%未満コンフルエンス）を培養しコールターモデルZM電子細胞カウンターで計数した。この2個のフラスコは約750,000の細胞を与えた（ほぼ1個のコンフルエンスフラスコに等しい）。80%コンフルエンスは825,000細胞に等しく、従って計算に使用した500,000細胞／フラスコは合理的と考えられる。単球／マクロファージ培地（RPMI 1840 + 抗生物質 + 1%Hepes + 10%加熱不活性化ウシ胎児血清 + 1%L-グルタミン）を加え、フラスコを5%CO₂インキュベーター中1週間保持し、単球をマクロファージの形まで成熟させた。成熟の際に1回培地を交換した。7日目に、各フラスコを新鮮な単球／マクロファージ培地で充分に洗浄した。残存する粘着細胞（これは付着して広がり、表面積の約80%を占めている）は吸引して培地を除去した。5ug/ml濃度のC¹⁴ラベルしたアセマンナンの5mlの液を3個の粘着細胞フラスコのそれぞれに加えた。

C. 逆体シンチレーションによるC¹⁴取り込みのアッセイのための調製工程

可溶化後、各管の内容物をバイレックスガラス瓶、ねじ栓付管に移し70°Cのオープンに入れた。内容物を消化させ約1mlになるまで容積を減少させた。管をオープンから取り出し、冷却し、多重過濾混合により管壁の乾燥物を溶解させた。この時点で、管は約1mlの黒ずんだ液体といくらかの不溶沈殿物を含んでいた。85%H₂O₂の0.2mlを上清管のそれぞれ及び対照管に加えた。管に栓をして暗所に一晩放置して、消化したC¹⁴を含む残存液体の最大限の脱色を行った。水0.3mlを細胞マス管のそれぞれに加えた。7個の消化管のそれぞれの内容物全体を20mlガラスシンチレーションバイアルに移した。各消化管を3mlのシンチバースバイオHP（フィッシャーサイエンティフィック）シンチレーション流体で洗浄し、シンチレーションバイアルに加えた。次にこのバイアルをシンチレーション流体で容積（20ml）いっぱいまで満たした。内容物を数回振り動かして混合し一晩放置して不溶物を沈殿させてから、パッカード・ミナクシ・トリーカーブ4000シリーズベータカウンターで計数した。

7個のサンプルのCPMに基づき有効なC¹⁴ラベルしたアセマンナンの取り込み百分率を計算した。この百分率を時間に對してプロットした。計算とプロットから細胞マスによる取り込みは、24時間で2.0%、48時間で5.16%、72時間で3.48%と決定された。さらに、7個のサンプルのカウントを合計して計算をした。この全百分率は使用したC¹⁴ラベルしたアセマンナンの全100ugを示している。合

特表平3-501624(39)

計カウントを用いてカウントした細胞マスのmg量を求めた。48時間5.16%の最大の取り込みは単球／マクロファージ細胞マスにより吸収または攝取されたC¹⁴ラベルしたアセマンナンの0.07mgに等しかった。細胞マス中に500,000の生存細胞が存在しそれぞれがC¹⁴ラベルしたアセマンナンの取り込みを行ったとすると、各細胞中のアセマンナンは 1.9×10^{-8} mgであった。ガイギーサイエンティフィックテーブル、3巻、205頁は、単球の容積を470フェミトリットル(fL)と述べている。各細胞の容積は単球がマクロファージに広がって行くので500fLと計算される。これは、3800フェムトグラム/fLのv/v値を示す。これを、C¹⁴ラベルしたアセマンナンのv/v値、5mg/mlと比較すると、細胞中の濃度は上清中より780倍高くなっている。

このバイロット研究に基づき、5mg/mlの濃度のC¹⁴ラベルしたアセマンナンの抽出可能量は、単球／マクロファージ細胞に対して毒性がなく、消化された細胞マスは重量／容積で消化されたアセマンナン溶液のv/v値より780倍高かった。

実施例 24

麻疹ウイルスに及ぼすアセマンナンのインピクト効果の予備的調査

VERO細胞の感受性培養物に麻疹ウイルスを加える前に、麻疹ウイルスを種々のアセマンナン濃度でインキュベートした。この実験の目的は、アセマンナンが感染を抑制するかすなわち感受性細胞培養物に導入する前に、アセ

マンナンで処理した麻疹ウイルスを不活性化するかどうかを調べることである。アセマンナン処理した麻疹ウイルス濃度25mg/mlにおけるウイルスの細胞毒性効果(CPE)が存在しないことから明らかのように、VERO単層に感染しなかった。CPEの完全な不存在はウイルス接種原中アセマンナン5mg/mlで達成された。

アフリカグリーンモンキーの腎臓細胞(VERO細胞)を標的細胞として使用した。麻疹ウイルスを濾定して、ウイルス／細胞単層に30~50ブラーク/ml(20T.CID単位/0.05ml)のブラークカウントを得た。次に、種々の濃度のアセマンナンを、この所定量のウイルスを含む培地に導入した。

アセマンナンの濃度は完全な組織培養培地で作った。風疹弱毒ウイルスワクチンの液を各濃度に使用した。混合物を30°Cで0.5時間予備インキュベートし、組織培養室の予め加熱したVERO単層に加えた。

コンフルエントVERO細胞単層上で丸5時間インキュベートした種々の濃度のアセマンナンと麻疹ウイルスを混合した結果を第24図及び表18に示す。

種々の濃度のアセマンナンによる反復攻撃により、保護濃度は2mg/ml~4mg/mlであり、これが、麻疹ウイルスの感染を抑制する遷移ゾーンであることがわかった。5mg/mlのアセマンナン濃度がアセマンナンで予備処理した麻疹ウイルスで攻撃されたVERO細胞単層に対する保護を与えることが明らかである。

表 18

アセマンナン濃度の効果

日付	DIL	ウイルス投与量	#	1	2	3	4	A.V.	% INF.
09/10/88	5	25	34	1(1)			1		0
	2.5	12.5	30	0			0		0
	1.25	6.25	15	1			1	8.25	
	0.625	3.125	12	4			4	93.3	
09/17/88	5	20	100+	0	0		0	0	
	2.5		20	50		25	25		
	1.25		00	80		50	60		
	0.625		100+	100+		100+	100+		
	0.3125		100+	100+		100+	100+		
	0.15625		100+	100+		100+	100+		
10/03/88	5.0	20	100+	0	1		1	<1	
	4.5		1	0		1	<1		
	4.0		0	2		2	-		
	3.5		10	1		5.5	0		
	3.0		0	0		4.5	5		
	2.5		5	9		7	7		
	2.3	10	0		0	0			
	1.0	5	0		0	0			
10/12/88	5.0	20	5.5	0	0	0	0	0	
	4.5		0	0	0	0	0	0	
	4.0		0	0	0	0	0	0	
	3.5		1	0	0	0	0.25	4.5	
	3.0		1	0	0	0	0.25	4.5	
	2.5		0	1	1	1	0.75	11	
	2.5	12.5	0	0	0	0	0	0	
	1.0	0.25	0	0	0	0	0	0	

表 18 (続)

アセマンナン濃度の効果

日付	DIL	ウイルス投与量	#	1	2	3	4	A.V.	% INF.
10/01/88	5.0	20	6.0	0	0			0	0
	4.5		4.5	0	0			0	0
	4.0		4.0	0	0			0	0
	3.5		3.5	0	2		1	16.0	
	3.0		3.0	1	2		1.5	25	
	2.5		2.5	3	3		3	50	
2.6	10		2.6	0	0		0	0	
	1.0	6	1.0	0	0		0	0	

このバイロット研究における麻疹ウイルスに対するアセマンナンの効果は、未処理(VERO細胞対照)、麻疹ウイルス(陰性対照)及び5mg/mlアセマンナンで処理した麻疹ウイルス感受性細胞を比較することにより行った。ブラークカウントアッセイにより決定されたアセマンナン予備処理ウイルス感受性培養物中のブラークの形成は著しく低下した。この処理ウイルスによる培養物の感染の完全な防止は、ウイルスを5mg/mlのアセマンナンで予備処理したときに達成された。

実施例 25

VERO細胞中の麻疹ウイルス感染を逆転するアセマンナンの能力

VERO細胞をアセマンナン5mg/mlを添加する前に麻疹ウイルスを40TCD₅₀/ml含む培地で種々の時間(0.5~6時間)インキュベートした。細胞を麻疹ウイルスに暴露

特表平3-501624(40)

表 19

VERO細胞の標準化インキュベーションの効果
麻疹ウイルスについてアセマンナン処理

日付	DIL	ウイルス接種量	#	1	2	3	4	AV.	INF.
09/23/85	5.0	0t	20L/0.5mL	25	25	25	10	21.25	100
		0.5 hr		1	3	10	2	3.5	18
		1.0 hr		1	10	0	10	9	42
		4.0 hr		8	21	25	7	15.25	71
		6.0 hr		X	18	15	4	12.3	58
11/14/85	5.0	0t	20L/0.5mL	13	17	17	25	18	100
		0.5 hr							
		1.0 hr バクテリア汚染されたアセマンナン							
		4.0 hr							
		6.0 hr							
06/10/87	5.0	0t	20L/0.5mL	100	100			100	100
		0.5 hr		8	8	10	9	8.75	14
		1.0 hr		10	8	9	11	8.5	15.5
		4.0 hr		25	15	25	30	23.75	38
		6.0 hr		24	24	25	31	26	42

グラフは、2回のアッセイの平均
 0t = 100%
 0.5hr = 15%
 1.0hr = 26.8%
 4.0hr = 54.5%
 6.0hr = 50%

した後アセマンナンとインキュベーションすると、VERO細胞を感染から保護しなかった。VERO細胞を次に新鮮な培地で洗浄して結合していないウイルスを除去した。5mg/mlアセマンナンを含む培地をこの培養物に加え、培養物を5日後細胞変性について検査した。

この実験の結果を第25図及び表19に示す。

0.5及び1時間アセマンナン予留インキュベーションした培養物では、より低い感染率であった。アセマンナンでより長い時間、後インキュベートした培養物ではVERO細胞の臨床的に有意な保護は認められなかった。

麻疹ウイルスで前インキュベートしたVERO細胞は、感染期間終了後アセマンナン5mg/mlを添加することにより有意に保護されなかった。

実施例 20

市販家禽における防御免疫応答の誘発に関する
カリシンTH抽出物の有効性の測定の研究企画

疾患及び死産に関与する問題からの損失は、全国的に家禽業界に20億\$/年以上を費やさせている。伝染性滑液包膜病ウイルス（IBDV）や免疫抑制剤と関連する死亡及び／又は病的状態を防ぐためのレトロウイルス等の伝染作用物は家禽産業に莫大な経済的損失を引き起こす。IBDVはファブリシス（Fabrelius）の包膜中のB細胞前駆体を特異的に攻撃し、免疫系の体液免疫（humoral arm）の選択的削減をもたらす。これはエイズ（AIDS、先天的免疫不全症候群）と同様の免疫抑制状態を生ずる。

家禽産業は、生きているウイルスの経口投与又は不活性化したウイルスの皮下注入により、定期的に群れをIBDVに対して予防接種している。両予防接種法は、免疫応答を効果的に引き出すことができるが、ワクチンの使用に関連する固有の問題を引き起こす。生きているウイルスワクチンは、特定の株に対する防御免疫応答の引き出す

ことにおいてより効果的であるが、ウイルス自身が有毒性に復帰することがあり、ワクチンの複製は一時的な免疫抑制を生じ、二次病原体に対する群れの罹患率を上昇させる。殺したウイルスワクチンは、生きているウイルスワクチンに間違するこれらの問題はないが、免疫反応性は減少し、投与量依存性である。複数のハイテク溶液を含む、多くの代わりの予防接種が評価されたが、殺したウイルスワクチンに追加成分を含む包含物による免疫応答の管理された調節は、潜在的な能力を有する単純な溶液を代表する。

予備的な観察に基づいて、カリシンTH抽出物は免疫調節剤として作用する。この研究計画は、この化合物が殺した伝染性滑液包膜病ウイルス（IBDV）ワクチンの免疫応答を刺激するかどうかの測定を行う為に計画された。

A. 動物

SPAFAS, Inc.から購入した卵を孵化したヒヨコを全ての実験に用いた。卵は孵化し、そして一日後のヒヨコはホースフォールユニット（Horsfall Units）に置いた。

B. 抗原

バルサバックK（BursaVac K）（オイルエマルジョン）—カリシンTH抽出物を使用：ロット#80226-001; 1又は2mg/ml再懸液（実験設計参照）

C. 実験設計：

研究#1（グループ1）：研究#1のため、25羽（2週齢）のヒヨコを5群に分けた。各群のヒヨコは下記の通り予防接種した。

特表平3-501624(41)

eg/ml) 0.25mlとの混合物(1:1)を皮下接種。

グループ6-背部にオイルエマルジョンワクチン0.5mlと水中に懸濁したカリシンTH抽出物(2mg/ml)0.5mlを皮下接種。

両研究において、1週間毎に各ヒヨコから血清を採取し、そして血清IBDV ELISA値は、市販のAgriTech IBDV ELISAキットを用いて測定した。ELISA値は、FlockChek software(AgriTech, Inc.から販売されているプログラム)を用いて測定した。

D. 結果

水中懸濁又はオイルエマルジョンのカリシンTH抽出物の皮下又は経口投与の結果、ヒヨコは苦痛又は副作用を示さなかった。

研究#1(グループ1)において、平均ELISA値は、接種後6週間に亘り表20に示した。

- グループ1-コントロール、偽接種。
 グループ2-背部に、オイルエマルジョンワクチン0.5mlを皮下接種。
 グループ3-オイルエマルジョンワクチン(Bio-Burs K; Key Vet., nesville, GA) 0.25mlと水に懸濁したカリシンTH(0.5mg/ml) 0.25mlとの混合物(1:1)を皮下接種。
 グループ4-酸性水中に懸濁したマイクロカプセル0.5mlを経口接種。
 グループ5-酸性水中に懸濁したマイクロカプセル0.5mlと0.5mgカリシンTH抽出物とを経口接種。
- 研究#2(グループ2)、研究#2のため、117羽のSPFヒヨコ(1週齢)を6群に分けた。各群のヒヨコは下記の通り予防接種した：
- グループ1-コントロール、偽接種。
 グループ2-背部に、水に懸濁したカリシンTH抽出物(2mg/ml)0.5mlを皮下接種。
 グループ3-背部に、オイルエマルジョンワクチン(Bio-Burs K; Key Vet., Gainesville, GA) 0.5mlを皮下接種。
 グループ4-背部に、オイルエマルジョンワクチン0.25mlと水中に懸濁したカリシンTH抽出物(1mg/ml)0.25mlとの混合物(1:1)を皮下接種。
 グループ5-背部に、オイルエマルジョンワクチン0.25mlと水中に懸濁したカリシンTH抽出物(2

表 20

		カリシンTH抽出物の免疫刺激作用: 研究#1						
		接種後日数						
グループ	抗原の表示	0	7	14	21	28	35	42
# 1	Cont	0	0	0	0	7	107	191
# 2	Eb	0	0	64	372	556	2184	983
# 3	Eb&Ca	0	6	281	1142	2276	4508	8101
# 4	Hic	0	0	0	2	5	61	127
# 5	Hic&Ca	0	0	1	0	13	150	0

一次予防接種の2週間後、IBDV値は、オイルエマルジョン又はカリシンTH抽出物を補充したオイルエマルジョンで処理されたヒヨコにおいて上昇が始まった。カリシンTH抽出物を補充したオイルエマルジョンワクチンで処理したヒヨコは、オイルエマルジョンワクチンで接種されたヒヨコより、オーバーオールの平均値が3.9倍高かった。接種3週間後、ヒヨコは、一次接種と同じ抗原混合物を受けることにより再接種された。二次接種1週間後、平均値比の差は約4.1に増加した。その後、両グループの平均値がそれらのピークに遅れた二次注入2週間後、比は約2.1に落ちた。二次接種3週間後、両接種されたグループの平均値は減少した。しかしオイルエマルジョン単独で接種されたヒヨコの値の減少は、カリシンTH抽出物を補充し

たオイルエマルジョンで免疫したヒヨコが81%であるのに對し、65%とより急激であった。カリシンTH抽出物を補充したオイルエマルジョンで処理された鳥において、高価の確率はカリシンTH抽出物の長い免疫刺激作用によるものと見られ、カリシンTH抽出物の持続効果を示すものである。

二次接種3週間後、オイルエマルジョンワクチングループ(#2)及びカリシンTH抽出物を補充したオイルエマルジョンワクチングループ(#3)のヒヨコは2つのグループ(A及びB)に再分割された。グループAのヒヨコは同種の生きているワクチン株で刺激され、グループBのヒヨコは毒性の野生株で刺激された。刺激3日後、全てのヒヨコは倒伏された。ワクチン株で刺激されたグループAのヒヨコにおいては免疫系に影響が認められなかった。しかし、グループBの全てのヒヨコは組織病理学的に説明される病变があった。これらは予期される結果であるが、もし一次接種だけされたヒヨコが刺激されたら、オイルエマルジョンワクチンのみを投与されたヒヨコにおける病変の大きな優位が認められたであろう。もしヒヨコが生きたウイルスワクチンで接種されたなら、同種のウイルス刺激に抵抗するヒヨコにおけるリンパ系組織の病変が認められるであろう。

研究#2において、グループの大きさ及び接種プロトコールは、変更された。テーブル21に示されるように、結果は一致していない。

表 21

カリシンTH抽出物の免疫刺激作用：研究#2

グループ	抗原の表示	IBDV ELISA値			Dev.
		0	7	14	
# 1	Cont	0	11	1	S.D. 0
# 2	Ca(0.5mg)	11	87	1	S.D. 0
# 3	Em	21	11	181	S.D. 671
# 4	Em&0.25mgCa	40	0	5	S.D. 11
# 5	Em&0.5mgCa	188	0	270	S.D. 824
# 6	EmRt&0.5mgCaL1	88	78	504	S.D. 842

注入後2週間の鳥において、違いがあることが最初に判る。予期される以上の不全の動物がある。ヒヨコが一群になっているいくつかのサイトでは、感染されていることが認められた。それらは圧迫壊死を有し、二次細菌感染に加え、卵放出をもたらす。後者の問題を解決する試みとして、ヒヨコは再群化し一般的な抗囲剤で処理した。しかし、上述の問題は多分粒体的免疫抑制に起因し、この研究の結果を無効にする。従って、実験は終了させた。

研究#2に関連するメガティップファクターにもかかわらず、カリシンTH抽出物は免疫系の総体的刺激効果を起こし、

ド類を含有するある種の致病の摂取を防えることによって改善することができる。このような食事療法をとることにより上記の症状は軽減される。患者にとって残された主な生物学的问题は細胞の成熟に必要な糖たんぱく質の合成阻害による小腸粘膜の成熟停止(132頁)である。このような小腸作用の欠陥により吸収面は減少するばかりでなく、必須アミノ酸、脂肪酸、ミネラル、ビタミン及び食物中に存在するその他の重要な分子状物質の吸収が不可能になる。

糖たんぱく質の合成に必要な物質であるマンノースを補助的に与えることにより、K_{HAX}速度を上昇し、糖たんぱく質の合成速度を高めることが予想される。酵素の合成は、マンノース代謝酵素によるリボソーナル(ribosomal)／糖たんぱく質の合成を促進する、重要なマンノース基質のアベイラビリティ(availability)によって促進される。このように糖たんぱく質の合成が促進されアベイラビリティーが増大することにより、小腸粘膜細胞が成熟し、スブルーや腹腔脳に付随する症状が緩和される。糖たんぱく質合成における熱力学的变化は、現在有効な治療法がまだ発見されていない他の病気においても利用することができる。

実施例 28 多発性硬化症

多発性硬化症は原因不明の神経病であり、これに対する有効な治療法は無い。患者のデータやデモグラフィーを分析すれば、この病気は、恐らくウイルス由来の伝染性媒体(Infection agent)、によって発病する可能性が高いということが分る。中枢神経系、脊髄液及び血清を分析する

それはカリシンTH抽出物投与部から遠く離れた部位に抗原を投与した試験における増強された免疫応答から認識することができる。当初の印象はカリシンTH抽出物はオイルエマルジョンワクチンと混合せねばならないということであったが、増強された免疫応答は抗原とカリシンTH抽出物とを別個に供給しても引き出せることは明らかである。この結果は、この化合物について、代わりの接種方法及び投与方法の調査を考慮させる。

カリシンTH抽出物は、アジュバント活性を有すると想われる。永続性を増強し、又は体内におけるIBDV抗原の効果的な提示は多分リンホカインの放出及び増大されたリンパ球応答をもたらすことは明らかである。カリシンTH抽出物は、オイルエマルジョンワクチンと混合せねばならない。増強された免疫応答は抗原とカリシンTH抽出物とを別個に供給しても引き出せると想われる。この結果は、この化合物について、代わりの接種方法及び投与方法の調査を考慮させる。

カリシンTH抽出物は、アジュバント活性を有すると想われる。永続性を増強し、又は体内におけるIBDV抗原の効果的な提示は多分リンホカインの放出及び増大されたリンパ球応答をもたらすことは明らかである。

実施例 27

ヒトの吸収不良症候群は典型的症状をもたらし、結果的には死に到らしめる。スブルー(熱帯性下痢)や腹腔病のような人間特有の症候群は、複合多糖類及び酵素阻害ペプチ

ことにより、自己免疫成分の存在も一つの要因と考えられる。この自己免疫応答はミエリン鞘の崩壊をもたらす。

粗朊培養物、動物及びヒトに見られるアセマンナン(acemannan)の抗ウイルス性に基き、多発性硬化症が免疫調節複合多糖に応答するか否かを調べる試みが初期になされた。5段階の症状の多発性硬化症患者の症状を臨床的に個々に診断したところ急激に症状が緩和され、これはアセマンナンに見られた神経的な有効性によるものである。

この臨床的応答の理論的根拠を下記に示す。

1. アセチル化オリマンナン(アセマンナン)の単核細胞／マクロファージ系誘導によるウイルス颗粒に対し非特異的なガンマインターフェロン及び特異的なアルファインターフェロンの誘発。
2. 免疫波に対する好ましい効果の活性化及び単核細胞／マクロファージ系による、原因物質に対するIL-1産生の細胞抗ウイルス作用。
3. 単核細胞／マクロファージ系によるインターロイキン-1の誘導によって自己免疫細胞の崩壊の防止に必要なT-8抑制リンパ球の規制力が弱められることが分った。
4. 神經生长因子(NGF)は8つの活性化単核細胞からLPSによって誘発される。マンナンはアセマンナンと同様に、LPSにおいて生物学的活性を有する成分である。ニューロロンから、活性化された神經突起が伸長し生長する過程に、シュワン細胞によるミエリンの製造があり、それにより損傷されて機能を失った神經が取り囲まれ

て神経インパルスの伝導機能が回復せしめられる。アセマンナンによるこの第4の効果は、多発性硬化症患者の神経機能の修復及び回復に有効であることは疑う余地がない。アセマンナンによる治療を受けた多発性硬化症患者の神経機能の回復は、動物に実験的に設けた特定の選ばれた症の病変やヒトの外傷が治癒する過程と同様に進行する。

キャリシンTMエキスの用途

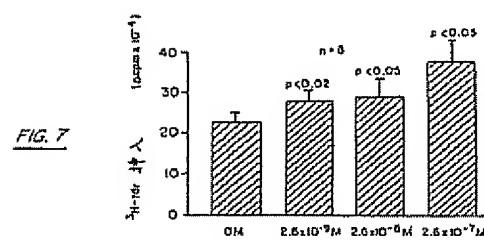
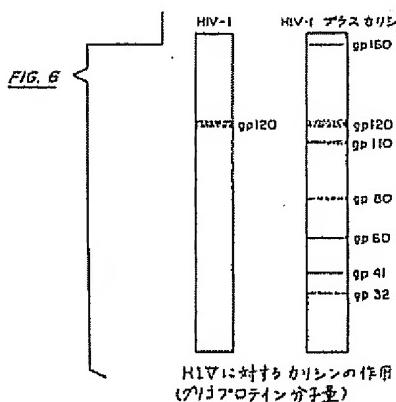
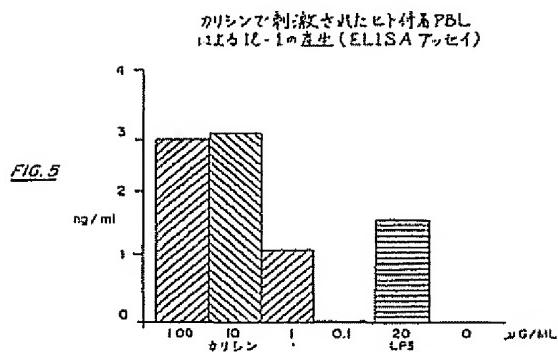
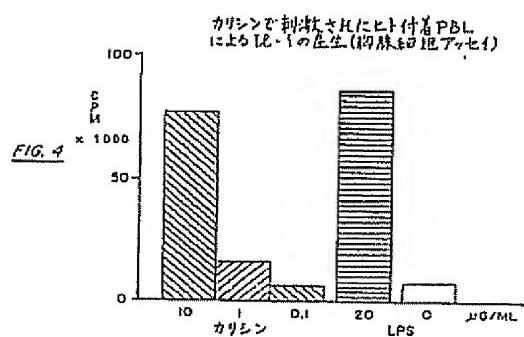
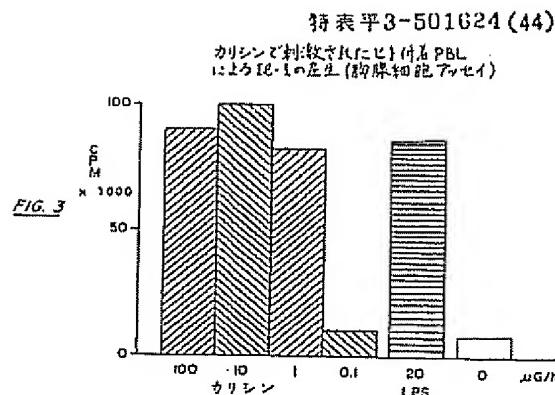
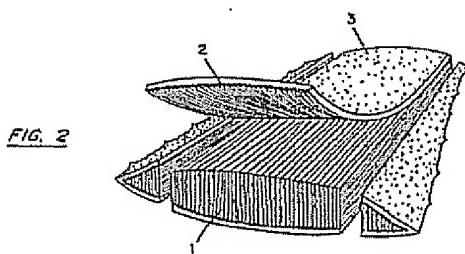
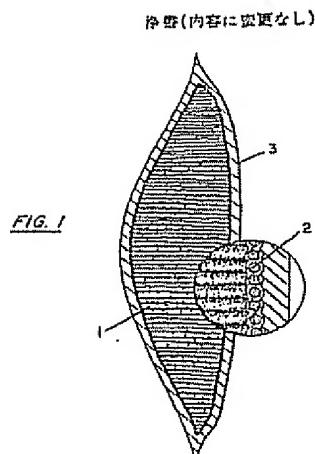
アセマンナンには数多くの用途がある。第1の用途は、免疫刺激性の抗腫瘍活性剤としてであり下記の疾患に対して用いられる：ウマの頸肉腫、ウシの眼球の網状細胞癌、イヌの性器肉腫、ネコの白血病及びウシの白血病；寄生虫によるあるいは伝染性皮膚疾患、例えば、ブドウ球菌性臍皮症、デモデコシス(demodectosis)、疥癬病、耳ダニ、ノミアレルギー；伝染性アレルギー性呼吸器疾患、例えば、ウシの輸送性肺炎、ウシの慢性咳、ウマの鼻出血；伝染性消化器疾患、例えば、ウイルス性又はバクテリア性の下痢、クリプトスピロジオシス症(cryptosporidiosis)、コクシジオイデス症；その他の全身性疾患、例えば、トキソプラスマ症。

アセマンナンの第2の用途は、キャリシン・エキスがウイルス性、寄生虫性もしくはバクテリア性の抗原を含有する非活性化ワクチン類に対する応答を促進するアグリベントであり、ワクチンとしては下記のものがある：ウシ類のワクチン—ウシの伝染性鼻気管炎、バラインフルエンザ3、呼吸器シンシチウムウイルス、ウシのウイルス

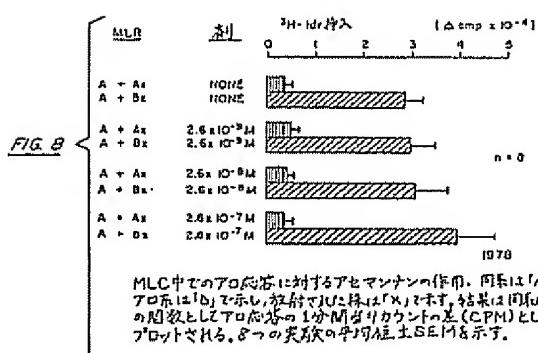
性下痢、ロタウイルス、コロナウイルス、脊髄病、狂犬病、クロストリジウム症、ヒツジの蹄軟化病(footrot)、伝染性急性結膜炎、アナプラズマ症、バベシア症、バストレラ症、サルモネラ症、大腸菌症、コリキバクテリテリウムS P症、ピブリオ症、ブルセラ症、レプトスピラ症、ヘモフィルス・ソムナス症、足及び口の病気、乳頭症ウイルス性及びブドウ球菌性の乳瘻炎に対して用いる；ヒツジのワクチン—クロストリジウム病、蹄軟化病、狂犬病、足及び口の病気、丹毒、結膜炎、乾酪性リンパ節炎に対して用いる；ブタのワクチン—バーポウイルス、丹毒、伝染性胃腸炎、拘狂犬病、気管支敗血症、大腸菌症、バストレラ症、足と口の病気、クロストリジウム病、レプトスピラ症、ヘモフィルス凹性胸膜炎に対して用いる；ウマのワクチン—インフルエンザ、鼻肺炎、破傷風、腺疾、ウマの動脈炎、東部ウマ脳炎、西部ウマ脳炎、ベネズエラ、ウマ脳炎、狂犬病に対して用いる；ネコのワクチン—鼻氣管炎、ネコの白血病、カリチウイルス、クラミジア症、レンチウイルス(tentivirus)、汎白血病、狂犬病、伝染性腹膜炎に対して用いる；イヌのワクチン—ジステンバー、アデノウイルス(1型及び2型)、狂犬病、バーポウイルス、はしか、ロドコッカス(rhodococcus equi)、破傷風、狂犬病に対して用いる；鳥類のワクチン—伝染性滑液膜病、ニューキャッスル病、伝染性気管支炎、伝染性咽頭気管炎、マレク病(Mareks disease)、コクシジウム症に対して用いる。

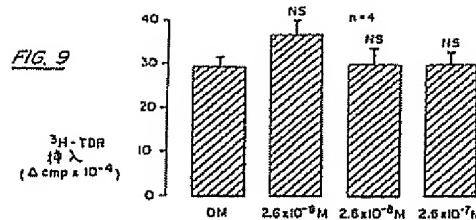
アセマンナンの第3の用途は、キャリシンがウイルスの複製(複製するためにはウイルスはそのたんぱく質をグリコシル化しなければならない)を阻止する抗ウイルス剤である。この効果はレンチウイルスに対して示されている。この抗ウイルス剤は下記のウイルスの複製を抑制するために用いることができる。レオウイルス、オルビウイルス及びロタウイルスをはじめとするレオウイルス属(reoviridae)(これらのものの例としてはウマのアフリカ病及び脊髄病があげられる)；エンテロウイルス、リノウイルス及びカリシウイルスをはじめとするピコルナウイルス属(picornaviridae)(これらのものの例としては、ポリオウイルス、足及び口の病気のウイルス並びにコクスサッキイ(Coxsackie)ウイルスがあげられる)；アルファウイルス及びフラビウイルスをはじめとするトガウイルス属(これらのものの例としてはウマの脳炎及びセントルイス脳炎があげられる)；オルトミクソウイルス(このものの例としては、インフルエンザウイルス、ニューキャッスル病ウイルスがあげられる)；はしかウイルス及び肺炎ウイルス(pneumovirus)をはじめとするバラミオウイルス(これらのものの例としては流行性耳下腺炎、はしか、バラインフルエンザ及び呼吸器シンシチウムウイルスがあげられる)；オンコウイルス(oncoviruses)及びレンチウイルスをはじめとするレトロウイルス(これらのものの例としてはヒト免疫不全ウイルス及びネコの白血病ウイルスがあげられる)；ラブドウイルス(rhabdoviruses)(このも

のの例としては狂犬病ウイルス及び小胞性口内炎ウイルスがあげられる)；リフトバリー病(Rift Valley fever)のようなバニアウイルス(bunyaviruses)；鳥類の伝染性気管支炎ウイルスのようなコロナウイルス；イタのバルボウイルス、ネコの汎白血病、及びミンクの脂炎などのバーポウイルス；パピロマ及びバボアウイルスをはじめとするバボウイルス類；アデノウイルス；ウシの伝染性鼻気管炎、堪純ヘルペスウイルス、ネコの鼻気管炎、水痘带、エプスタイン・バー(Epstein Barr)ウイルス及びサイトメガロウイルスのようなヘルペスウイルス；オルトポックス(orthopox)ウイルス及びパラポックス(parapox)ウイルスをはじめとするポックスウイルス(これらのものの例としては、ワクシニア及び天然痘(variolin)があげられる)；A型及びB型肝炎をはじめとする肝炎ウイルスなどである。

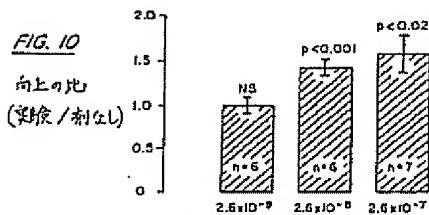


混合リンパ細胞反応(MLC)におけるアロ点滅に対するアセマシナント作用。アセマシナントの種々の濃度と合成LPS ($1 \mu g/ml$)、カリクルム化チミジン(1μg/ml)によるIL-2産生量の割合比較。剤は、MLCの開始時に加えた。8つの実験の平均値±SEMを示す。

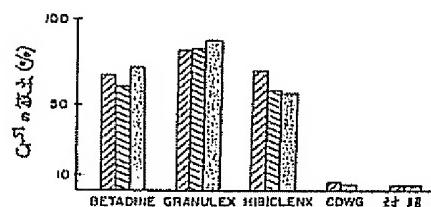
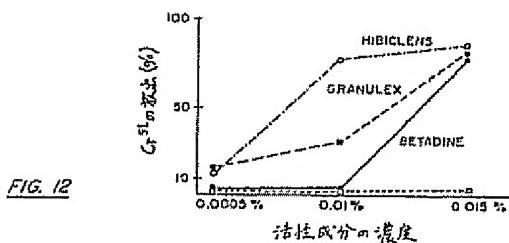
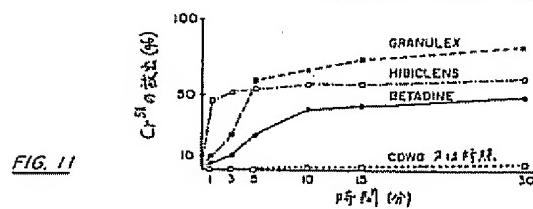




折れ線均MLCの各に対するアセマンナンの作用。トリカウムヒドロジンの溶液の20分持続濃度の割合を比較する。
各の実験の平均値±SEHを示す。

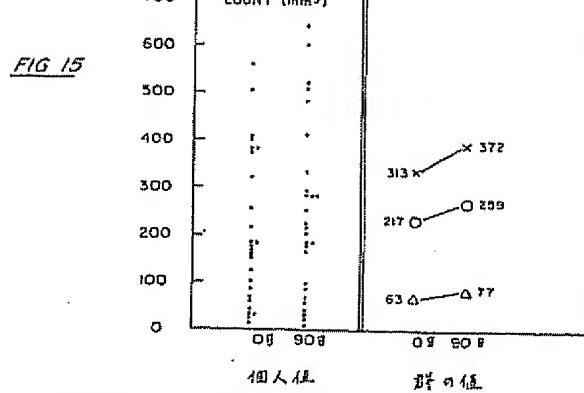
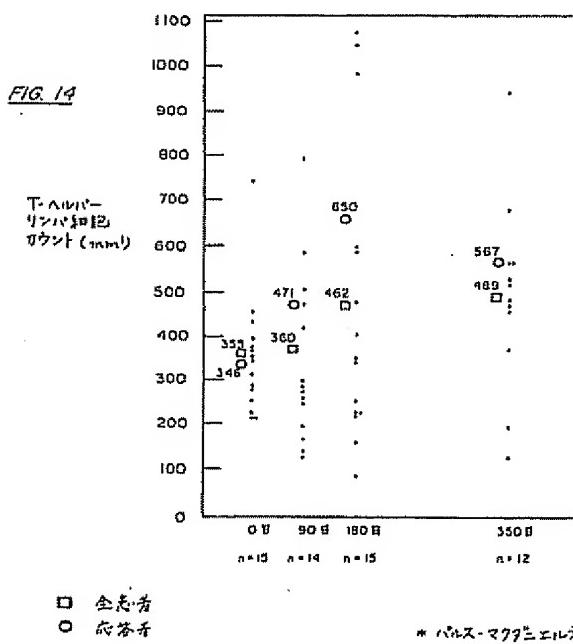


单核細胞・T細胞培養に対するアセマンナンの作用。使用のCPMに対するCPMを片側のくびきに付けるCPMの割合による向上比についての各濃度での活性剤との比較。各の実験の平均値±SEHを示す。



第1群^aにおけるアロエベントリック投与を受けた15人のHIV感染患者における絶対T-4ヘルパーリンパ細胞(mm^3)の変化。

第2群^bにおけるアロエベントリック投与を受けた26人のHIV感染者における絶対T-4ヘルパーリンパ細胞カウント(mm^3)の変化。



- 過去に生じた感染症の歴史ありの患者における10人の患者についての絶対T-4ヘルパー細胞カウント
- 過去に生じた感染症の歴史なしの患者についての平均の絶対T-4ヘルパー細胞カウント
- × 健康な成年者における16人の患者についての絶対T-4ヘルパー細胞カウント

FIG. 16 において 350 名のアロエドリンク経口投与された
15人のHIV患者に対する修正ウォルターリードスコア

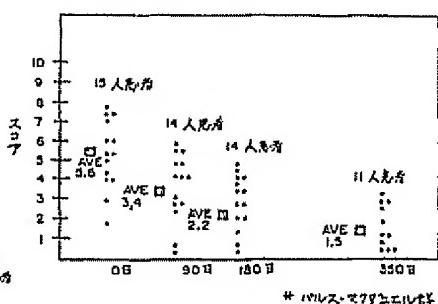


FIG. 16

FIG. 17 において 260 名のアロエドリンク経口投与された
26人のHIV患者に対する修正ウォルターリードスコア

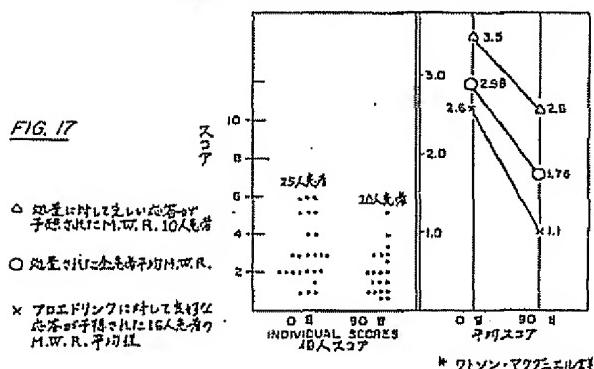


FIG. 17

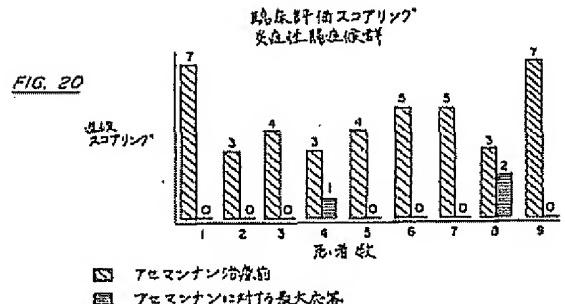


FIG. 20

■ アセマンナン治療前
■ アセマンナンに対する最大反応

FIG. 18 において 260 名のアロエドリンク経口投与された
26人のHIV患者に対する修正ウォルターリードスコア

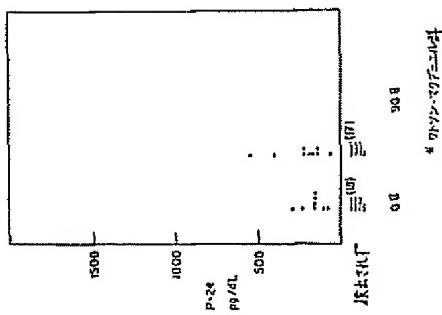


FIG. 18

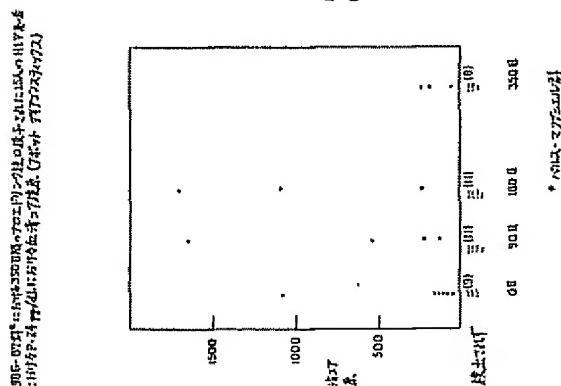
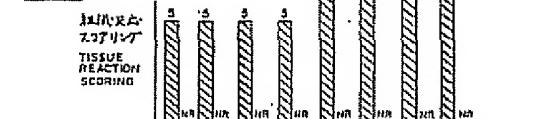


FIG. 18

粘膜生検評価
炎症性細胞浸潤

FIG. 22



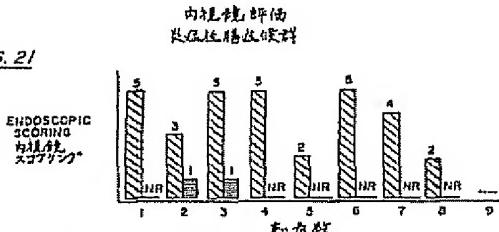
■ アセマンナン治療前
■ アセマンナンに対する最大反応
□ 炎症性細胞浸潤を呈した患者
--- 内視鏡検査を行った患者

FIG. 23 胃底潰瘍アセマンナンバイロット試験研究のまとめ

CASE NO.	PATIENT NAME	年齢	性別	コード 名	ENDOSCOPIC SCORING 内視鏡評価		ENDOSCOPIC SCORING 炎症性細胞 浸潤評価		ENDOSCOPIC SCORING 組織評価		ENDOSCOPIC SCORING 粘膜生検評価	
					PRE RX	END RX	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
1	S.O.	24	F	I37487	1/24/85 200mg QID	7/7/85	7	1/7/86	0	NR	0	NR
2	B.Y.	38	F	I17788	1/23/85 200mg QID	8/4/85*	3	12/30/85	0	0/27/86	0	NR
3	G.M.	50	M	I01050	1/23/85 200mg QID	1/1/86*	4	12/1/86	5	2/1/86	0	4/6/86
4	J.M.	33	F	I44205	2/20/85 200mg BID	8/4/85*	3	7/23/86	1	8/23/86	0	NR
5	B.T.	34	P	I42280	4/17/85 100mg BID	8/4/85*	4	5/2/86	1	5/2/86	0	NR
6	F.D.	34	M	I37898	4/20/85 CATALOG	8/4/85*	0	1/22/86	0	1/22/86	0	NR
7	H.C.	21	M	I41807	5/20/85 500mg QID	8/4/85*	0	4/26/86	1	4/26/86	0	NR
8	S.R.	33	M	I44108	5/2/85 500mg QID	8/4/85*	2	7/3/86	2	NR	0	NR
9	K.O.	48	M	O.P.	4/5/85 500mg QID	5/17/85	7	0**	0	0	0	0

* -DO PUT ON HOLD BY INVESTIGATOR DUE QUESTIONS FROM FDA & FDA HOLD ON AIDS DO
** -NO FLARE FOR 2 YEARS, LONGEST INTERVAL IN LAST 20 YEARS
NR -PATIENT DID NOT RETURN

FIG. 21



■ アセマンナン治療前
■ アセマンナンに対する最大反応
NR = 捕獲されず。検査と組合せた患者
--- : 内視鏡検査を行った患者

手稿補正書（方式）

平成3年1月30日

特許庁長官 柏松 敏 殿

1. 事件の表示

PCT/US89/03381

2. 発明の名称

アロエ組成物およびその使用

3. 指定する者

事件との関係：特許田願人
住 所：子モリ内会費圖

住所 ノルシング音楽部、チャップス 13052、ノービング・
イースト ロッシェル ボウルバード 1300
名 称 カーリントン ラボラトリーズ
インゴーポレー テッド

4. 代 理 人

平183

住 所 東京都港區西新橋1-17-1 西新橋小川ビル3階 電話 03 (3504) 1978
姓 名 (8554) 勉理士 梶井義夫

民 命 (33) 5 植正會の日付

平成3年12月25日（發送日：昭和3年1月22日）

明治三十二年六月

6 刑事の対象 (1)

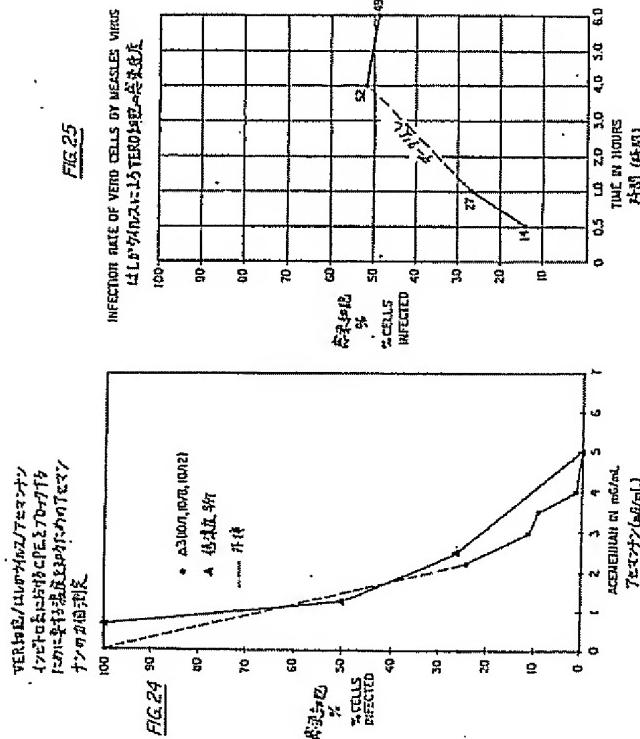
(1) 特許法第13条の第1項の規定による審査の特許出願人の権利」
 (2) 「明細書請求の範囲、要件の中の

(3)「代理権を証明する書面」
別紙の通り、但し、開封書、認證の範囲

卷之三

翻訳文の書き込みに変更なし。

方略



FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<p style="text-align: right;">Int'l. Maritime Organization Ref. PCT/DSB/03301</p> <p>V. <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CAPTAIN CLAIMS HE WAS FOUGHT UNBEARABLY</p> <p>This International Search Report has been established in respect of Article 19(1)(a) under Article 19(1) of the Paris Convention.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they relate to a subject matter it had no power to be ascertained by this Authority, namely:</p> <p> </p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Captain number _____, because they relate to part of the International Information that is missing or the prescribed formality is not observed so that the International Search Report can be carried out, specifically:</p> <p> </p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they are incomplete or not drawn in accordance with the second and third sentence of Article 19(2).</p> <p>VI. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNIT OF INVENTION IS LACKING</p> <p>The International Searching Authority found no relevant documents in this International examination as follows:</p> <p style="text-align: center;">See attachment sheet</p> <p> </p> <p><input checked="" type="checkbox"/> An International search report has been made by the applicant, the International Search Report covers all international claims of the International Application.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> An early copy of the requested International patent has been made, paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the International Application for which fees were paid, specifically claims:</p> <p> </p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No detailed search report has been made by the applicant. Consequently, this International Search Report is concerned to the International Search mentioned in the claims it is covered by (see below).</p> <p> </p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Any recommendations for an opposition against the application, including its opposition fee, the International Searching Authority do not accept.</p> <p>Reason for Power:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> The additional search has been conducted by applicant's request.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No power is granted for payment of additional search fees.</p>	